

FÁBIO MIYAJIMA

**"ASPECTOS FUNDAMENTAIS DA VALIDADE
JURÍDICA DAS PROVAS EM DNA"**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção de grau de Mestre
em Odontologia Legal e Deontologia**

**PIRACICABA-SP
2001**

FÁBIO MIYAJIMA

**"ASPECTOS FUNDAMENTAIS DA VALIDADE
JURÍDICA DAS PROVAS EM DNA"**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção de grau de Mestre em
Odontologia Legal e Deontologia**

Orientador: Profº Dr. Miguel Morano Júnior

Banca Examinadora:

Profº Dr. Antônio José Brussolo da Cunha

Profº Dr. Eduardo Daruge

Profº Dr. Miguel Morano Júnior

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 20 / 08 / 2001

**PIRACICABA-SP
2001**

Miguel Morano Júnior
Assinatura do Orientador

166211008



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PIRACICABA

DATA: 30
CHAMADA: T/UNICAMP
M699a
EX:
WBO BC/ 46-201
C. 16-392101
: D
Q* R\$ 11,00
A 13/09/01
CPD

CM00159495-6

Ficha Catalográfica

Miyajima, Fábio.
**M699a Aspectos fundamentais da validade jurídica das
provas em DNA. / Fábio Miyajima. -- Piracicaba, SP :
[s.n.], 2001.
xxviii, 193p. : il.**

**Orientador: Prof. Dr. Miguel Morano Junior.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.**

**1. Genética forense. 2. Odontologia legal. 3.
Homem – Identificação. 4. Medicina legal. 5. Redação
técnica. I. Morano Junior, Miguel. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159,
da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Abril de 2001, considerou o candidato FÁBIO MIYAJIMA aprovado.

1. Prof. Dr. MIGUEL MORANO JUNIOR

2. Prof. Dr. ANTONIO JOSÉ BRUSSOLO DA CUNHA

3. Prof. Dr. EDUARDO DARUGE

Dedicatórias

“À DEUS, o autor de minha vida e a fonte de tudo que sou.

À Ele seja dado toda a honra, por escolher este vaso e usá-lo para Sua glória.”

“À minha amada companheira Veridiana, dos momentos certos e principalmente dos incertos, pelo seu incansável amor, afago e incentivo nas decisões mais difíceis”.

“Aos meus pais, Décio e Akemi, pelo empenho e esmero com que me encaminharam para vida, pelo precioso consolo nos momentos de aflições, pela maturidade na correção juvenil, e pelo amor transmitido desde meu advento”.

“À minha 2ª mãe, Nadja, pelo calor e carinho de um segundo lar, pelos cuidados e providências inerentes a um estudante fora do aconchego da família, e pela longanimidade exemplar para com todos”.

“À Juliana, minha cunhada, pela sua vida, pela sua luta, enfim, pela sua vitória sob a graça de Deus”.

Agradecimentos

Ao Profº Dr. Eduardo Daruge, precursor de minha carreira acadêmica, coordenador e constante incentivador de meus trabalhos, primeiramente por acreditar em mim e aceitar este desafio, e em especial por me fazer ciência de que a percepção aguçada e a dedicação são imensuráveis diferenciais no crescimento científico.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Profº Dr. Antônio Wilson Sallum, onde tive a estrutura física e social para encontrar o caminho das pedras.

Aos colegas Hamilton Jordão Júnior, Cátia Fernandes Lopes e Welbe Oliveira Bragança pelo modo especial com que me atenderam, pela contribuição científica e pela solidariedade para com meus problemas pessoais.

Ao Profº Dr. Miguel Morano Júnior, pelo empenho exigido desde o início da orientação.

Ao Profº Dr. Antônio Brussolo da Cunha, pela simplicidade no atender, por todo o incentivo dispensado nestes anos.

À grande amiga Sílvia Maria Anselmo por se predispor em ser uma ouvidora e um ombro amigo constante dos meus objetivos

Aos Profºs: Dr. Sérgio Danilo Pena, Dr. Rodrigo Moura Neto e Dr. Dario Grattapaglia pelo material científico gentilmente cedido.

Ao Profº Dr. Eduardo Daruge Júnior pela sua incondicional simplicidade e autocontrole com que lida as situações mais adversas.

À Mestre Marisa Chesky e colegas do HCPA, pelo carinho, pelos conhecimentos, pelo breve, mas marcante momento que estive convosco, por acreditarem irrestritamente em mim como profissional e como pessoa.

Ao Dr. José Arnaldo Soares Vieira, à Mestre Edna Iwamura pelos imprescindíveis materiais bibliográficos, pelas experiências transmitidas, em especial no início dos meus estudos.

Ao colega Malthus Fonseca Galvão pelos conhecimentos e experiências transmitidos, pela sua incansável dedicação na qual me espelho.

Aos Profºs Drs Eduardo da Silva Reis, Casimiro de Abreu Possante de Almeida, Beatriz Sotille França pelos conselhos na lapidação do meu aperfeiçoamento profissional e emocional.

Ao colega Luís Francisquini Júnior pela admirável competência com que representa nosso curso de pós-graduação.

Às funcionárias do Departamento, representadas pela Célia, Dinoly, Cidinha, Marcela. Companheiras de luta.

À coordenação de Pós-Graduação desta Faculdade, por todo o suporte prestado e pela paciência em me esclarecer e dirimir dúvidas, representando: Érica, Sônia e à Profª Dra. Altair Antonina Del Bel Cury.

Aos funcionários da biblioteca da FOP, em especial à bibliotecária Marilene Girello, pelas relevantes correções e orientações prestadas na revisão deste trabalho.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial aos Professores do Departamento de Odontologia Social.

A todos os alunos e ex-alunos do curso de Pós-graduação em Odontologia Legal e Deontologia da FOP/Unicamp, representados pelos colegas: Fernando, Cristiane, Renato, Washington, Romildo, Sérgio, Isa, Gilberto, Célio, Presa, Augusto, Queiroz, Cel. Alinor, Febe, Andréia, Tânia, Cléa, Simone, José Carlos, Mitsuo, Radicchi, Chain, Helisson, Saturnino, Chen, Roque, Ricardo, Marcelo, Cláudia, e outros, pela convivência, pelas alegrias nas reuniões e pelo aprendizado em família.

Especial agradecimento à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, que tanto me amparou nestes meses de profundas mudanças na minha vida.

A você, prezado leitor, que é o principal motivo e grande fonte de inspiração deste trabalho.

**“A verdadeira Ciência nos conduz à
verdadeira Fé e vice-versa”**

**“Conhecimento e Conscientização
são a alma do processo de
libertação do empirismo e do pré-
conceito”**

Sumário

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	01
LISTA DE ABREVIATURAS	03
RESUMO	05
ABSTRACT	07
1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO DE LITERATURA	59
3. PROPOSIÇÃO	75
4. MATERIAIS E MÉTODOS	77
5. RESULTADOS	83
6. DISCUSSÃO	157
7. CONCLUSÃO	165
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	181
GLOSSÁRIO	183

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	Constituição do nucleotídeo	29
FIGURA 02	Dupla cadeia de DNA.	30
FIGURA 03	Etapas de codificação do complexo DNA e RNA	31
FIGURA 04	Complementariedade das bases nitrogenadas do DNA	32
FIGURA 05	Lei da segregação independente	33
FIGURA 06	<i>Crossing over</i> entre os cromossomos homólogos durante a meiose	35
FIGURA 07	Disposição do genoma	39
FIGURA 08	Tipos de mutação	41
FIGURA 09	<i>Crossing over</i> desigual	41
FIGURA 10	Polimorfismo de VNTR	42
FIGURA 11	Polimorfismo de inserção	43
FIGURA 12	Escolha de uma região alvo para a PCR	50
FIGURA 13	Ilustração de Mendel e suas ervilhas	62
FIGURA 14	Purificando o DNA	90
TABELA 01	Localização cromossômica de alguns marcadores para tipagem de DNA	92
FIGURA 15	Locais de amplificação do <i>locus</i> amelogenina nos cromossomos X e Y	99



TABELA 02	Alguns dos marcadores para tipagem de sexo e generalidades	100
TABELA 03	Freqüência alélica do locus D2S44	107
FIGURA 16	Digitalização de auto-radiografia	108
FIGURA 17	Utilização de um software específico para a localização de bandas	108
FIGURA 18	Determinação automática de cada banda, em pares de bases	109
FIGURA 19	<i>Locus vWA</i> com o alelo 20	110
FIGURA 20	<i>Primer multiplex</i> para 16 STR	115
FIGURA 21	Padrão alélico de 440pb em DNA mitocondrial humano	125
FIGURA 22	Cromossomo Y e alguns dos seus <i>loci</i> STR mais comumente estudados	126
FIGURA 23	Padrão alélico em um locus onde houve inclusão de paternidade	127
FIGURA 24	Padrão alélico em um <i>locus</i> onde houve uma exclusão de paternidade	128
FIGURA 25	Programa de cálculos estatísticos para freqüências alélicas em VNTR	134
FIGURA 26	Mapa cromossômico do CODIS	152
FIGURA 27	Dr Eduardo Daruge com um laudo de paternidade clássico e um de DNA	159
FIGURA 28	O DNA e o HOMEM	163

LISTA DE ABREVIATURAS

Índices quantitativos e sua respectiva ordem de grandeza (conforme *Système International des Unités*):

E	-	exa	10¹⁸	d	-	deci	10⁻¹
P	-	peta	10¹⁵	c	-	centi	10⁻²
T	-	tera	10¹²	m	-	mili	10⁻³
G	-	giga	10⁹	μ	-	micro	10⁻⁶
M	-	mega	10⁶	n	-	nano	10⁻⁹
k	-	quilo	10³	Å	-	ângstron*	10⁻¹⁰
h	-	hecto	10²	p	-	pico	10⁻¹²
da	-	deca	10¹	f	-	fento	10⁻¹⁵
				a	-	ato	10⁻¹⁸

* - Não previsto no SI
(*Système International des Unités*)

AABB (*American Association of Blood Banks*) - Associação Americana de Bancos de Sangue

ABO - Sistema sangüíneo ABO

CODIS (**CO**mbined **Dna** **I**ndex **S**ystem) - Índice de DNA em Sistema Combinado

dNTP - Deoxinucleotídeo trifosfato

DNA (*desoxirribonucleic acid*) - Ácido desoxirribonucléico

EDTA (*etilenodiaminotetracetic acid*) - Ácido etilenodiaminotetracético

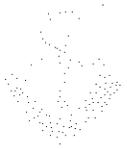
FBI - (*Federal Bureau of Investigation*) Agência Federal de Investigação (EUA)

FSS (*Forensic Science Service*) - Serviço de Ciências Forenses da Inglaterra

HLA (*human leukocyte antigen*) - Antígeno Leucocitário Humano

HVR (*hypervariable region*) - Regiões hipervariáveis

IPC - Índice de paternidade combinado



IP – Índice de paternidade

ISFH (*International Society of Forensic Hematology*) – Sociedade Internacional de Hematologia Forense

INTERPOL (*International Criminal Police Organization*) – Organização Policial de Crimes Internacionais

MN – Sistema sangüíneo MN

mtDNA – DNA mitocondrial

NRC (*National Research Council*) – Conselho Nacional de Pesquisa

NIST (*National Institute of Standards and Technology*) – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (EUA)

pb – Pares de bases

PCR (*polymerase chain reaction*) – Reação em cadeia da polimerase

PE – Poder de exclusão

RFLP (*restriction fragments of length polymorphism*) – polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição

Rh – Sistema sangüíneo Rh

RNA (*ribonucleic acid*) – Ácido ribonucléico

STR (*short tandem repeats*) – Pequenas repetições consecutivas

Taq polimerase – Polimerase da alga *Thermus aquaticus*

VNTR (*variable number of tandem repeats*) – Repetições consecutivas de números variados

W – Probabilidade de paternidade

As investigações científicas que fundamentam as decisões jurídicas ganharam uma base extremamente sólida com os avanços alcançados na tecnologia em DNA. Os testes realizados com os ácidos nucléicos apresentam uma base de identificação positiva, permitindo aos peritos das áreas biológica ou jurídica tomarem decisões de caráter definitivo. Até outrora, os métodos tradicionais de tipagem sorológica apresentavam diversos fatores limitantes, tais como, não tinham um grau de heterogeneidade, de polimorfismo, e especialmente de acuracidade, suficientes para uma inclusão de identidade. Tais exames apoiavam-se somente em alguns casos isolados, onde o diagnóstico era exclusivamente o de exclusão.

A capacidade identificatória dos testes em DNA é tão precisa e individual que justifica o nome pioneiramente utilizado para expressá-la, a impressão digital genética *fingerprints*. Entretanto há diversos aspectos a serem considerados, para que este salto tecnológico, de herói não passe a vilão, principalmente quando se considera a superestimação da real potencialidade



destes testes, além de que, o emprego desta técnica, em especial no Brasil, é muito recente, existindo ainda abismos de desuniformidades no padrão de qualidade dos laboratórios e institutos. Há também um imenso e vasto campo ainda a ser criteriosamente estudado, com as mais diversas variantes a serem consideradas, principalmente quando se transporta ao âmbito criminal, onde as amostras biológicas, quase na sua totalidade, não são encontradas nas suas condições ideais, e a coleta inúmeras vezes é feita de maneira totalmente inadequada.

No presente trabalho foi analisada a idoneidade dos resultados destas novas técnicas, destacando etapas passíveis de erros e suas conseqüências jurídicas e sociais, além de elucidar ao público leigo alguns aspectos técnicos fundamentais, como a análise criteriosa dos estratosféricos índices de inclusão divulgados maciçamente e indiscriminadamente, e sugerir algumas medidas cautelosas para uma real e eficaz aplicabilidade destas técnicas.

Scientific investigations, which establish juridical decisions, have acquired a reliable basis due to advances achieved in DNA technology. The tests performed with nucleic acids have presented a positive prove type, thus allowing definitive decisions characters to be established by experts of biological and juridical areas.

Formerly the traditional methods of serological types presented important restriction factors, for instance, they didn't have sufficient rates of heterogeneous, polymorphism and specially polishment to include identity or paternity, hence, they conclude clearly only in rare and isolated caseworks, whose the diagnostics were exclusively of exclusion one.

The identification ability of DNA tests is extremely precious and particular, which justifies the pioneer name appointed to them, fingerprints DNA. However, there are many aspects to be considered, so that this great improvement doesn't become a villain; especially when consider the super estimation of the real possibilities of these exams. Furthermore, especially in Brazil, these techniques are extremely recent, with presenting great



differences of qualities standards between laboratories and institutes. Big conquests will be necessary and they must be applied for scrutiny and so the most variants must be considered, specially in criminal area, where the biological samples discovered, in almost cases, don't have the ideal conditions of exam, and the collection, frequently, is performed improperly and entirely wrong.

At the current work, it has been analyzed the idoneousness of results in these techniques, mentioning stages susceptible to mistakes and the main juridical and social consequences, besides elucidating to the society some important technical aspects, such as the scrutiny of the incredible rates of paternity and identity index unconsciously made public, and finally propose some carefully standards of measure for a real and efficient applicability of DNA methods.

1.1. Aspectos Gerais:

Como cita a tradicional história bíblica da criação do mundo em Gênesis: "haja luz. E houve luz". No começo do século 20, contudo, recriou-se a luz. A lâmpada iluminou os lares e dissipou as trevas, outrora dominantes absolutas das noites (GONZÁLEZ & SPOTORNO, 2000). Um filamento de tungstênio, criado pelo engenhoso Thomas Alva Edson, foi o prenúncio da *luz* e de grandes avanços para esta era. Aos olhos da ciência e da tecnologia, nunca a humanidade se desenvolveu tanto, a ponto de se dizer que, aproximadamente 90% dos cientistas de nossa história localizaram e localizam-se nestes últimos cem anos. O ímpeto científico humano nunca esteve tão sedento pelo descobrir e pelo saber como hoje, a ponto de obter-se, por exemplo, intemeratas provas de investigação de paternidade e de identificação criminal. Se por um lado, merecidamente progredimos, por outro, existem os *bugs* sociais. Da ausência de senso dos limites racionais de sua atuação, dos surtos de



distúrbios sociais, o homem torna-se cúmplice de seus próprios erros.

No 6º período da criação, segundo as conhecidas escrituras sagradas, disse Deus:

“Frutificai e multiplicai-vos, enchei a terra, e sujeitai-a. Dominai sobre os peixes do mar, sobre todas as aves dos céus e sobre todos os animais que se arrastam sobre a terra” (BÍBLIA...2000)

Talvez apenas o próprio Deus pudesse prever de antemão onde a genial, a imaginativa, mas eventual maquiavélica mente do homem pudesse chegar. Depois de se articular no mundo, num clima de aparente submissão, o homem resolveu que queria ser o destruidor da vida também, e agora mais recentemente o co-criador dela (LANE, 1999; SILVA NETO, 2000).

Muito provavelmente este trabalho não seria desenvolvido se não existissem conseqüências da falta de ética e dos surtos de desordens sociais intra e inter sociedades, tais como: a eugenia artificial pela clonagem humana, a inseminação artificial com

desprezo e sacrifício de material biológico vivo (MARTINEZ, 1998), o crime, talvez o pior deles, e a investigação de paternidade.

Interessante abordagem faz SIMAS FILHO (2000) quando questiona com destreza: “se se fala em paternidade, por que investigá-la?” Relata ainda que isto se origina da extrema necessidade do filho, concebido fora da sociedade conjugal, em conhecer seu genitor, em opor-se-lhe o patronímio e estar em ligação a ele, na condição de herdeiro. Alguns números, trazidos em matéria de capa pela revista Veja, servem para elucidar parte destas causas. Eles demonstram que, mais de 25% dos homens casados traíram a mulher no último ano, 30% das mulheres entrevistadas não têm orgasmo sexual em suas relações, e em três gerações a idade da primeira relação das mulheres caiu cinco anos (BUCHALLA, 2001). Os paradigmas mudam cada vez mais rapidamente. Sobre o futuro, há muitas perguntas sem respostas. Como ficará a sociedade, a instituição da família, do casamento?

Em um mundo sedutor e calculista, onde milhões são gastos em campanhas de prevenção, mas milhares se contaminam por vias venéreas, e onde outras milhares de pessoas são



desgastadas com ações judiciais de reconhecimento de paternidade com conseqüências psicológicas irreversíveis, simplesmente há alguns milhares de anos também, já se havia inventado a solução para tais problemas, inclusive o sexo seguro: o tradicional casamento monogâmico sem filiais ou sucursais. Quem diria que, algum dia, isto seria um conceito em demasia complexo para a atual sociedade? Emendando-se com questionamentos mais remotos, pergunta-se: Por que adular? Por que matar? Por que dar asas às suas próprias torpezas? Muito desses sintomas e outros mais são de origem exclusiva de nossos padrões sociais, do insuficiente autocontrole e da desobediência racional individual a certos padrões mínimos. O homem não tem suficiente domínio e maturidade para lidar com os desígnios que lhe coube desde seu advento, muito menos onisciência para determinar regras, organizar uma sociedade, antever e julgar fatos. Desde os primórdios, estas sempre foram algumas das diversas atribuições sensivelmente deficitárias deste ser. O homem continua e vai continuar vivendo cercado de dúvidas e surpresas. Com expressões típicas como: "nem tudo o que reluz é ouro", "o mundo dá voltas", referimo-nos usualmente a situações algo

surpreendentes e inusitadas. Quem poderia imaginar que um indivíduo, que dormisse todos os dias até ao meio dia, que duas vezes fosse demitido do trabalho, que usasse drogas e bebesse meia garrafa de *whisky* todas as noites, pudesse ser um dia governante de uma grande nação? Por outro lado, seria menos surpreendente um condecorado herói de guerra, vegetariano, não fumante, irrepreensível profissional, tornar-se, também um dia, presidente de uma grande nação? Entretanto, ao afirmar que estes dois exemplos fictícios são reais, o destino reservou surpresas, onde o primeiro se chamava Winston Churchill, e o segundo, o ainda mais notório, Adolph Hitler. Analogicamente, seria também, no mínimo curioso, questionar com um leigo, como que o estudo de ervilhas poderia estar intimamente relacionado com a identificação criminal de um estupro.

Das surpresas e imprevistos surgiram grandes descobertas da ciência, na genética exemplificadas pelas leis de segregação mendeliana. Inusitadamente, o monge agustiniano Gregor Johan Mendel, nos jardins de seu monastério na cidade Tcheca de Brünn, atual Brno, abriu caminho para os estudos e conquistas da



genética (HAUSMANN, 1997), especificadamente em DNA, a molécula da vida (FARAH, 1997), ou como alguns corretamente a chamam de: a *marca de Deus*, porque não se pode apagá-la (SIMAS FILHO, 2000).

A capacidade investigatória do homem cresce vertiginosamente e a níveis exponenciais. Das descobertas simples de Mendel até o seqüenciamento do genoma humano, inúmeros foram os detalhes que contribuíram para o contínuo e espantoso progresso nessa área. Originalmente como um único filo, a genética hoje apresenta inúmeras ramificações, cujas aplicações são coadjuvantes essenciais no desempenho de inúmeras atividades cotidianas. À medida que o homem estudava suas propriedades, o DNA vislumbrou a todos com suas características tão peculiares, onde suas aplicações mudaram de uma vez para sempre os rumos da ciência biológica. As descobertas de algumas dessas peculiaridades, como: a sua universalidade entre os seres vivos, a sua similaridade em todos os tecidos de um mesmo indivíduo, a sua perenidade no decorrer da vida humana, a sua conformação espacial em dupla hélice, a sua replicação semi-

conservativa, a disposição antiparalela da dupla fita, a complementariedade de suas bases nitrogenadas, a presença de regiões codantes e de DNA repetitivo e o caráter de transmissão hereditário mendeliano com recombinações inter-cromossômicas, permitiram ao homem atingir metas outrora não vistas, tais como: a análise de vínculo de parentesco, identificação humana e criminal, análise molecular de fósseis humanos de 8000 anos e de animais extintos, como os mamutes, análises de mutações de culturas de células, *pegas* ou quimerismo completo em transplantes de medula, aconselhamento genético, diagnóstico de anomalias e análise de parentesco pré-natal através de amniocentese e vilosidades coriônicas, diagnóstico de câncer (analisando mutações em células tumorais), contribuições relevantes à genealogia antropologia e arqueologia humana e diagnóstico inter-espécies (HERMANN & HUMMEL, 1994; KAYSER *et al.*, 1997, PEREZ-LEZAUN, 1997), sendo inclusive utilizado pela legislação canadense no rigoroso controle à caça, onde até se comparou sangue de urso encontrado na neve com carne em congelador (FARAH, 1997).



1.2. Aspectos jurídicos

A partir da obstinação científica, o homem chegou ao desconhecido a partir do conhecido, do visível chegou ao invisível, do macro para o micro, do micro para o pico. A identificação pelos materiais biológicos sempre foi algo que instigou os cientistas. As proteínas foram o marco inicial destas análises. Landsteiner, em 1900, através do conhecido sistema ABO, inaugurou o caminho para que análises de vínculo genético pudessem ser realizadas com sucesso atualmente (CALABREZ & SALDANHA, 1997) (DARUGE JR, 1998) (OZAKI, 1999). Quando encerrava sua carreira declarou que, um dia, chegar-se-ia à identificação completa, isto é, um perfil genético identificaria o autor, a partir de vestígios de materiais biológicos (SIMAS FILHO, 2000). Esta ambição do homem tem atingido seu clímax com a utilização das técnicas em DNA, tanto que a obtenção de um retrato fantasma, a partir de pequenas amostras biológicas de um local de crime, parece ser um objetivo muito próximo atualmente. Contudo, para o êxito da aplicabilidade legal das provas em DNA, sabe-se que muito se herdou da mais avançada jurisprudência internacional,

mas também muito se deve ao aprendizado obtido a partir de nossa experiência histórica no direito familiar, no civil e penal, e nas análises genéticas primordiais, principalmente em investigação de paternidade, em reconhecimento de legitimidade de filiação e sucessão, e em identificação forense.

Desde os tempos mais remotos, os homens sempre se aventuraram em relações amorosas, colocando no mundo filhos sem o reconhecimento paterno. Atualmente, no Brasil, existem mais de 10.000.000 de crianças nascidas como conseqüências de relações extraconjugais ou até mesmo de pais solteiros, mas que não assumiram a paternidade destas crianças. Embora o Estado procure assumir a tutela para garantir os procedimentos para os reconhecimentos paternos destas crianças, pouquíssimas ou quase imperceptíveis são as entidades estatais que realizam estas provas gratuitamente.

Segundo as lições do grande jurista brasileiro Yussef Said Cahali, o reconhecimento da paternidade no Direito Brasileiro evoluiu em cinco etapas (CAHALI, 1999). Primeiramente, aplicavam-se as normas das Ordenações Filipinas que admitia o



reconhecimento do filho ilegítimo, encarregando-se a mãe de criá-lo de leite até três anos, e o pai, de fazer todas as despesas, sendo proibida a sucessão legítima, mas não a testamentária. Em seguida, surgiu a Lei 463, de 02 de setembro de 1847, que estabeleceu que os filhos espúrios passariam a desfrutar dos mesmos direitos que os legítimos, se reconhecidos mediante escritura pública ou em testamento. Em 1916, entra em vigência o Código Civil, Lei 3.071, de 1º de janeiro daquele ano, em que no Artigo 358 estabelecia a absoluta impossibilidade do reconhecimento dos filhos incestuosos e adulterinos, artigo este que somente foi expressamente revogado pela Lei 7.841, de 17 de outubro de 1989, determinando que o reconhecimento do filho havido fora do matrimônio é permitido sem restrição alguma, texto este combinado com os Artigos 26 e 27 do Estatuto da Criança e do Adolescente (NEGRAO, 2001). Neste período mais antigo, as provas da pretensão de uma paternidade fundamentavam-se basicamente nos escritos deixados pelo verdadeiro pai ou ainda pelas provas documentais que eram acostados a um processo dessa natureza.

Em 1942, o Decreto 4.737 possibilitou o reconhecimento do filho adulterino, porém apenas após o desquite ou a dissolução da sociedade conjugal pela morte de um dos cônjuges. A evolução da legislação acompanhava o desenvolvimento dos problemas sociais, surgindo a Lei 883, em 1949, que ampliou a possibilidade do reconhecimento dos filhos, em todos os casos de posterior dissolução da sociedade conjugal (CAHALI, 1999).

Primordialmente, a base jurídica destes pedidos na Justiça apoiava-se nos textos constitucionais. Com o advento do Código Civil, o Artigo 363 assim determinou: "Os filhos ilegítimos de pessoas que não caibam no Artigo 183, ns. I a VI, têm ação contra os pais, ou seus herdeiros, para demandar o reconhecimento da filiação. Posteriormente, este Artigo foi alterado pelo Artigo 227, parágrafo 6º, e pelo Artigo 20 do Estatuto da Criança e do Adolescente, Lei 8.560, de 22 de dezembro de 1992, atribuindo nova redação, passando a ser redigido da seguinte forma: "Os filhos tem ação contra os pais...". Nota-se que foi eliminado do texto do referido artigo a expressão "ilegítimos", eliminando



discriminações de filiação, equiparando de forma absoluta os filhos de qualquer condição jurídica (GONÇALVES, 2000).

Outro aspecto legal que merece esclarecimento consiste no Artigo 338 do Código Civil, quanto à presunção legal de paternidade. Este artigo dispõe que se presumem concebidos na constância do casamento: "I- os filhos nascidos 180 (cento e oitenta) dias, pelo menos, depois de estabelecida a convivência conjugal (Artigo 339); II- os filhos nascidos dentro dos 300 (trezentos) dias subsequentes à dissolução concepção. No primeiro caso depende da convivência. No segundo caso, este argumento do suposto pai não poderá prevalecer quando os cônjuges mantêm relacionamento amoroso fora daquele período. Entretanto, a jurisprudência vem solucionando estas situações através de provas genéticas, uma vez que nem a própria confissão materna é suficiente para excluir a paternidade, conforme dispõe o Artigo 346 deste mesmo diploma legal (SIMAS FILHO, 2000).

Quanto a ação negatória de paternidade, conforme dispõe o Artigo 344 do Código Civil, embora os Artigos 178, parágrafos 3º e 4º, inciso I, estabeleçam prazos de decadência extremamente

exíguos para a contestação da paternidade, as correntes jurisprudenciais tem afirmado que a ação negatória de paternidade, por tratar-se de ação de estado, como a ação investigação de paternidade, é imprescritível (cf. TJSP, 5ª Câmara, Ap. 64.598-4 Barueri, j. 14-05-98, *apud* GONÇALVES (2000)).

Também o Estatuto da Criança e do Adolescente, Lei 8.069/90, colaborou para que a inflexibilidade da presunção de paternidade fosse afastada, determinando no seu Artigo 27 o que segue: "o reconhecimento do estado de filiação é direito personalíssimo, indisponível e imprescritível, podendo ser exercitado contra o pai ou seus herdeiros, sem qualquer restrição".

Além destes textos legais, a Jurisprudência tem reforçado este entendimento, no sentido de permitir as ações negatórias de paternidade pelas provas em DNA (ácido desoxirribonucléico), conforme decisão da Quarta Câmara do Superior Tribunal de Justiça, em recurso especial nº 4.987 e este mesmo Tribunal em julgamento STJ, 3ª T., Resp 40.690-0-SP, Rel. Costa Leite, j. 21-02-95, v.u.



Após esse período extremamente empírico, nas primeiras quatro décadas do século XX, os tribunais passaram a aceitar as provas genéticas, inicialmente através dos grupos sanguíneos do Sistema ABO. Em 1940, a descoberta dos Fatores Rh, e seus derivados pelo sistema Fisher-Race, através do complexo CDE/cde, com as variantes Cw e Du, deram novo impulso para uma maior admissibilidade dessas provas. Paralelamente a estes fatos, diversas descobertas foram realizadas nessa área através da identificação de outros marcadores eritrocitários, desta forma, aumentando-se a possibilidade de que provas genéticas excluíssem uma falsa paternidade, e conseqüentemente, admitidas unanimemente pelos Tribunais (DARUGE, 1976). Em 1952, Jaz Duarte identificou que os soros de alguns indivíduos politransfundidos aglutinavam os leucócitos de outros indivíduos. Mais tarde, Dausset caracterizou a existência de um complexo de Antígenos Leucocitários Humanos, ao qual denominou de HLA (NAVARRO, 1997), aumentando-se ainda mais as possibilidades investigativas das provas genéticas, principalmente em análises de vínculo familiar, proporcionando mais segurança e melhores condições para o julgamento dessas questões pelas autoridades

judiciárias. Embora até hoje se realizem todos estes exames, há de se ressaltar que estes somente perduraram em virtude de sua praticidade e seu custo operacional, pois o valor legal destas provas só é absoluto quando exclui a possibilidade de um acusado de paternidade ser o pai biológico de uma determinada pessoa. Por outro lado, até a presente data, quando as provas judiciárias associadas a estes exames formarem uma convicção satisfatória, os Juízes ainda têm julgado pela procedência e validação da ação que investiga a paternidade de um demandado.

A partir das descobertas de WATSON & CRICK sobre a estrutura helicoidal dupla da molécula de DNA na década de 50, inúmeros foram os seus frutos científicos (HAUSMANN, 1997), em especial os de ALEC JEFFREYS na década de 80, onde aprofundando-se nos estudos da engenharia genética contemporânea, desenvolveu uma metodologia específica para a análise de vínculo de parentesco e também para a identificação humana a partir de DNA, sobretudo embasando-se na impossibilidade da existência de duas pessoas com a mesma codificação ou padrão de DNA, justificando-se assim a especial



expressão atribuída a estas técnicas ainda hoje, impressão digital genética (JEFFREYS, 1985a). Hodiernamente, pesquisadores estrangeiros e nacionais vêm-se dedicando a fundo em busca de novos e revolucionários progressos nessa área, numa instigante corrida de competição, onde o prêmio, além da sociedade científica e financeira dos envolvidos, é o almejado entendimento para a aplicabilidade de todo esse emaranhado de códigos moleculares.

Apesar de toda esta revolução científica e do aparato tecnológico trazido pelo progresso, não se deve superestimar, nem tampouco sacralizar, os valores destas provas, pois elas apresentam suas limitações técnicas, assim como qualquer outro exame identificatório (DRUMOND, 2000). Além do mais, a utilização de siglas e códigos peculiares, de metodologias e técnicas bastante complexas, além dos efeitos causados pela massificação do idioma norte-americano, tornaram a tarefa de interpretação dessas técnicas por parte dos profissionais leigos, extremamente penosa e difícil, em especial aos do meio jurídico, policial e político.

Para isto, é de maior interesse neste trabalho, enriquecer conhecimentos de biologia molecular aplicados às ciências forenses, a fim de se discutir oportunamente sobre a sua validade jurídica e seus padrões de admissibilidade.

Vale salientar que na impossibilidade de se estabelecer parâmetros comparativos, isto é, quando não há possibilidade de se comparar uma amostra em questão com um suposto envolvido, ou vice-versa, seja pela ausência de um deles, seja pela qualidade das provas apresentadas, torna-se, então, inviável a efetividade de qualquer técnica de identificação, mesmo as mais sofisticadas, como as em DNA.

A utilização das técnicas de DNA veio a substituir de uma maneira mais segura as técnicas tradicionais de tipagem sangüínea. Devido ao seu alto poder de informação, além do usual emprego dessas técnicas nos tradicionais casos de investigação de paternidade, elas são empregadas na solução de evidências associativas em locais de crime e como grande coadjuvante dos tradicionais métodos antropológicos de identificação humana *postmortem*, como: a dactiloscopia, os exames da arcada dentária



e os exames médico-legais (JARRETA, 1998). Quando da impossibilidade do emprego destes métodos, o uso do DNA é especialmente indicado (LEE, 1994). O seu uso tem-se expandido também porque estas técnicas são menos influenciadas pelos eventos de decomposição, de fragmentação, de carbonização parcial e excepcionalmente podem ser efetivas em alguns casos de inexistência de dados *antemortem*, em especial quando existem supostos parentes da vítima, sendo consideradas como a última grande linha de identificação, por exemplo, nos casos de desastre de massa (JARRETA, 1998; MIYAJIMA, 2000). Indubitavelmente, todos estes progressos têm contribuído de forma imensurável na solução dos mais diversos problemas de investigação de paternidade, de identificação humana, na elucidação de crimes, nas averiguações de grau de parentesco, nos estudos das origens populacionais, entre outros, onde as autoridades policiais e judiciárias impreterivelmente têm necessitado fundamentar-se em provas de maior solidez e confiabilidade para, enfim, decidirem por uma justa sentença. O DNA é um desses grandes coadjuvantes judiciários, digno de uma honrosa citação sherlockiana, ou mesmo de um veredicto: "...com distinção e louvor".

1.3. Noções Básicas de Biologia Molecular

É necessário, sobretudo, entender como todas as funções vitais de um organismo é conduzido a partir de simples moléculas de ácido desoxirribonucléico.

1.3.1 Generalidades

A célula é a unidade fundamental da vida. Nos organismos unicelulares, todas as funções vitais estão concentradas em uma única célula. Nos multicelulares, o número de células varia conforme o organismo estudado. Acredita-se, por exemplo, que o homem tenha mais de 10 trilhões de células, isto é, 10^9 células (FARAH, 1997). A grosso modo, pode-se dividir a célula em três principais estruturas: membrana plasmática, citoplasma e núcleo. Dentro do núcleo, o material genético acha-se distribuído na forma diplóide de 46 cromossomos, contendo dois haplótipos, isto é, dois conjuntos de 23 cromossomos (sendo 22 autossômicos e 1 sexual), a este conjunto completo de cromossomos haplóides denomina-se genoma. Os cromossomos são estruturas compostas por proteínas (histonas) e ácido desoxirribonucléico (DNA) bastante condensados, de tal forma que se fossem



descondensados e dispostos linearmente, uma única célula teria 2m de material genético (JARRETA, 1998).

Uma molécula de DNA é denominada de nucleotídeo e constitui-se de um açúcar ou pentose, denominado desoxirribose, um grupo fosfato e uma base nitrogenada (FIG 01), esta última dividida em dois tipos: pirimidinas (citosina e timina), e purinas (adenina e guanina). A cadeia de DNA é composta por uma dupla hélice e disposta de forma antiparalela. As cadeias são ditas antiparalelas porque as ligações fosfodiéster, entre os nucleotídeos de um mesmo filamento, correm sempre no sentido do carbono 5 da pentose para o carbono 3 da pentose do nucleotídeo subsequente, de sorte que um fita corre em um sentido e a complementar em sentido oposto, inclusive nos processos de replicação, que é o processo de duplicação da cadeia do DNA. A fita de DNA é ligada à sua oposta por pareamento entre as bases nitrogenadas, obedecendo, sobretudo, a lei da complementariedade dessas bases, onde, via de regra, somente existem pareamentos entre adenina(A) e timina(T), com duas

pontes de hidrogênio, e entre guanina(G) e citosina(C), com três pontes de hidrogênio (FIG 02).

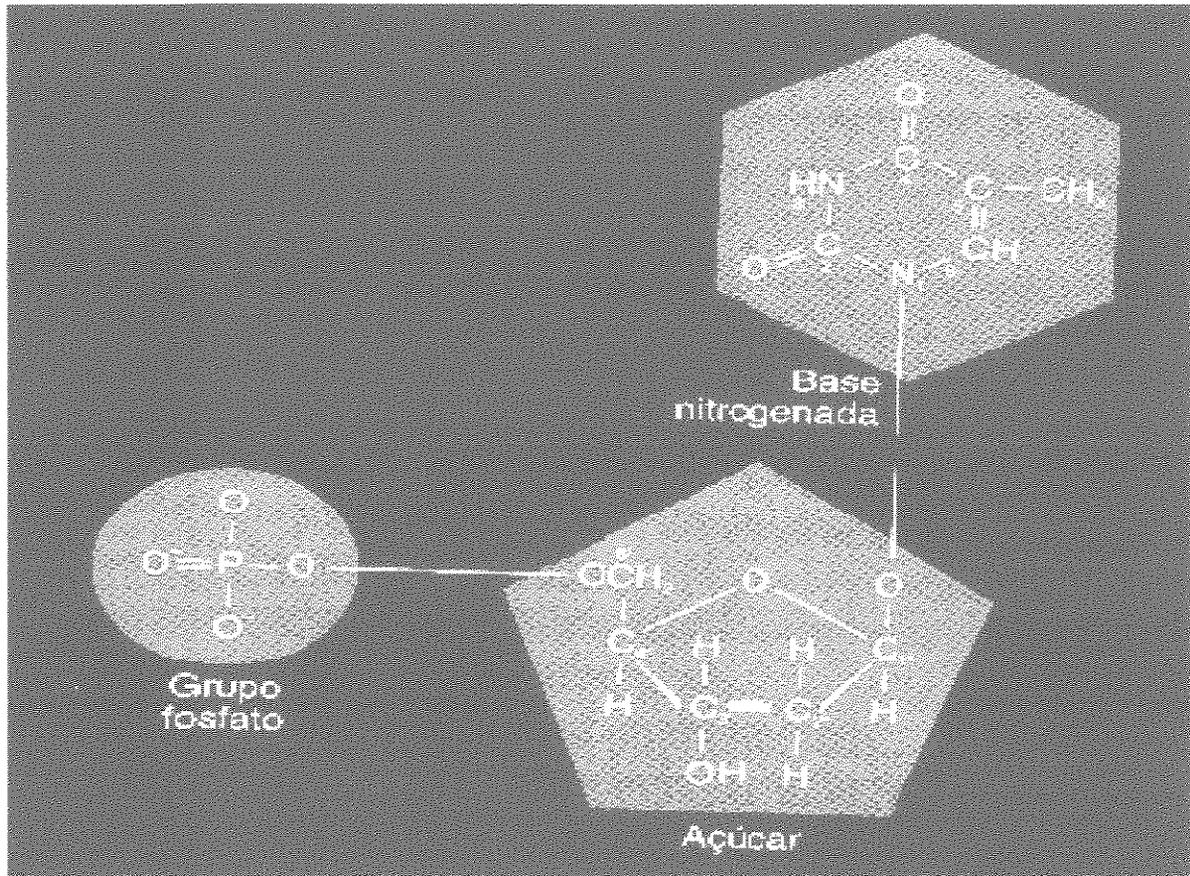


FIGURA 01 - Constituição do nucleotídeo em grupo fosfato, açúcar ou pentose e base nitrogenada

As seqüências das bases nitrogenadas A,C,G,T, dispostas no genoma, são a forma de codificação e armazenamento de todas informações genéticas. A expressão gênica é realizada através da síntese protéica pelo RNA (ácido ribonucléico), sendo este gerado



a partir da fita *non-sense* ou *template* do DNA. Resumidamente, o processo de codificação do RNA mensageiro(RNAm) a partir do DNA é denominado transcrição. O processo de síntese protéica, a partir da leitura do mRNA, é chamado de tradução, e o processo de duplicação do DNA chama-se replicação (FIG. 03).

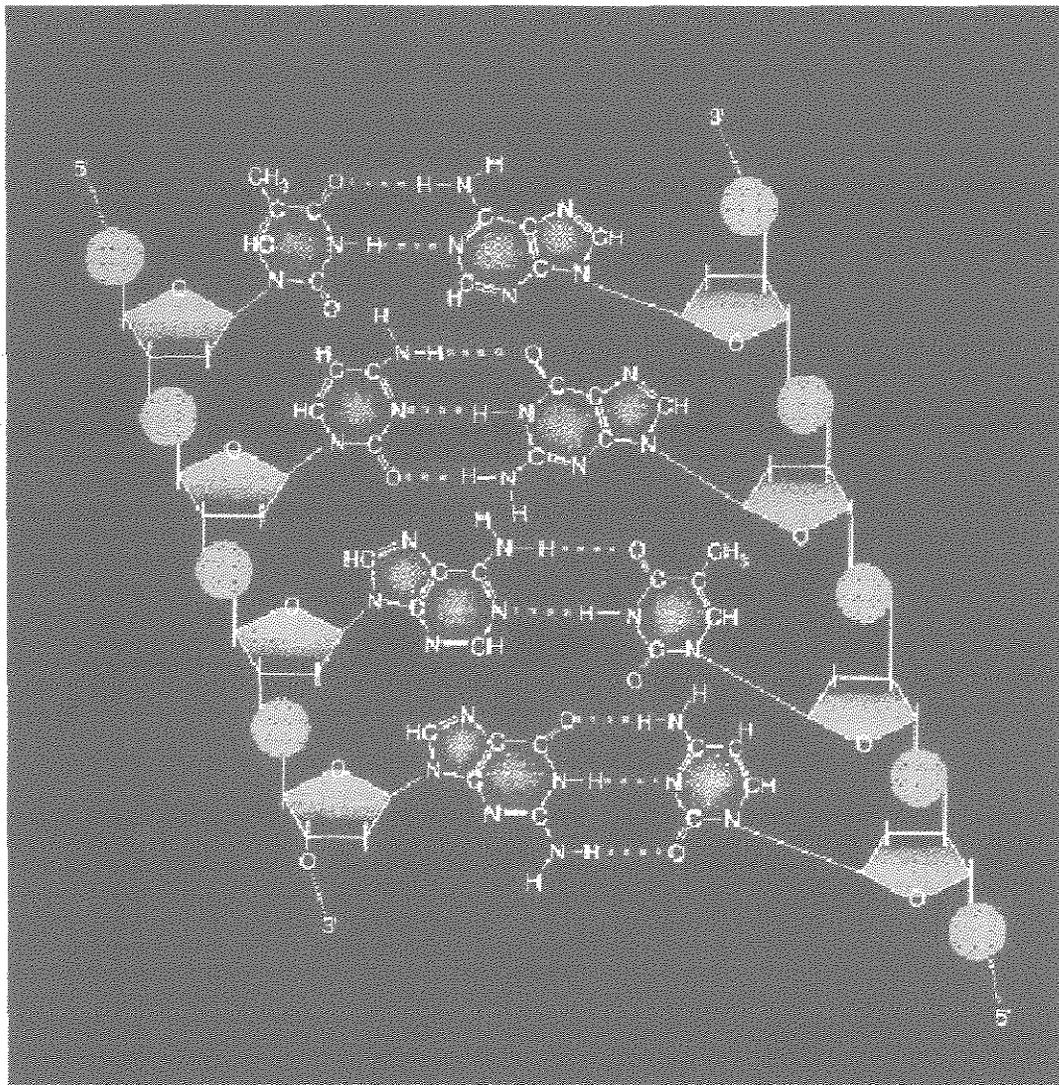


FIGURA 02 - Dupla cadeia de DNA. Notar pontes de hidrogênio entre os pareamento das bases nitrogenadas A-T e G-C, e as ligações fosfodiéster dos nucleotídeos no sentido 5' -> 3'

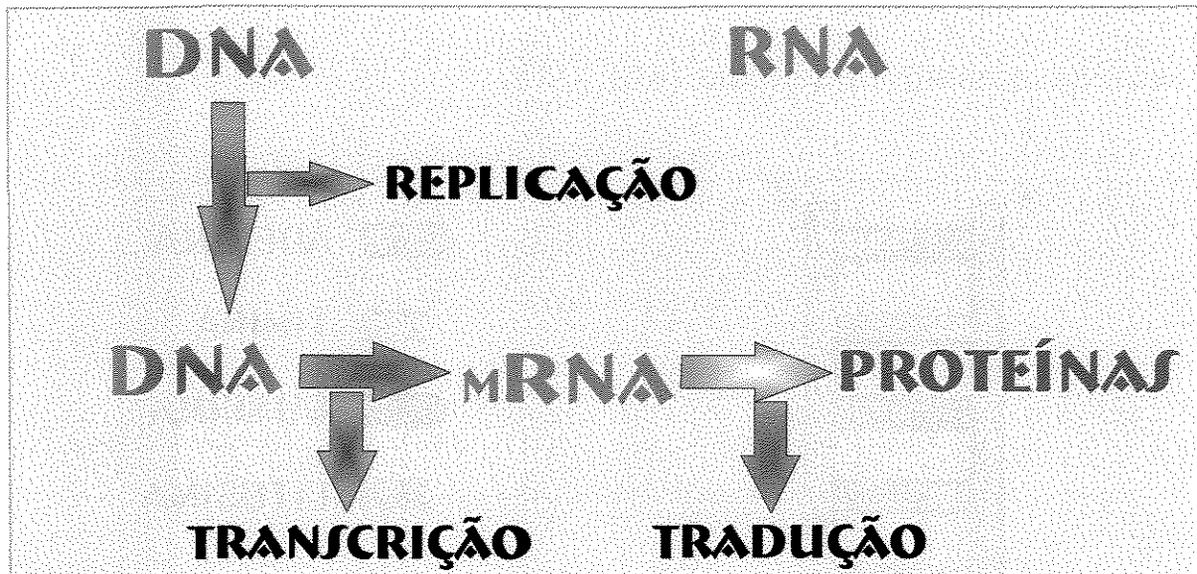


FIGURA 03 – Etapas de codificação do complexo DNA e RNA

1.3.2 Principais propriedades do DNA

- Universalidade entre os seres vivos: presente em todos os seres eucariontes superiores, possibilita comparações inter-espécies e a terapia gênica utilizando-se de microorganismos como os fagos e bactérias.
- Absorver luz ultravioleta de 260nm de onda: permite a quantificação do DNA extraído por espectrofotometria.



- Complementariedade de suas bases nitrogenadas (A-T e C-G): especificidade gênica, além de permitir a individualização e o sequenciamento do genoma (FIG. 04).

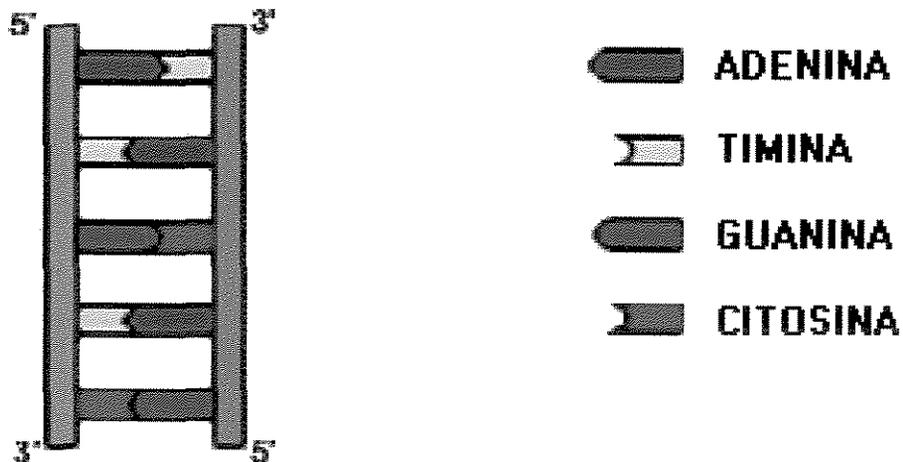


FIGURA 04 - Complementariedade das bases nitrogenadas do DNA

- Duplicação: manutenção da informação genética durante o processo da divisão celular
- Replicação semi-conservativa: garante integral transmissibilidade do material genético e menor susceptibilidade a erros.
- Individualidade gênica: seqüências totalizando 3,1 bilhões de pares de bases tornam um indivíduo único entre todos os outros, à exceção dos gêmeos univitelinos.

1.3.3 Leis da genética que determinam a individualidade do DNA

- Lei da segregação independente ou herança mendeliana: os dois componentes de um par de genes, os alelos, jamais estão presentes em um mesmo gameta, pois se segregam para gametas diferentes. Isto permite dizer que 50% de nosso material genético vêm da mãe biológica e os 50% remanescentes do pai biológico, isto é, em um par de cromossomos homólogos sabe-se que um cromossomo veio da mãe e o outro do pai, e a herança dos alelos de cada cromossomo é independente em relação aos correspondentes do seu homólogo. Isto ocorre tanto nos genes, como nas demais regiões do genoma (FIG. 05).

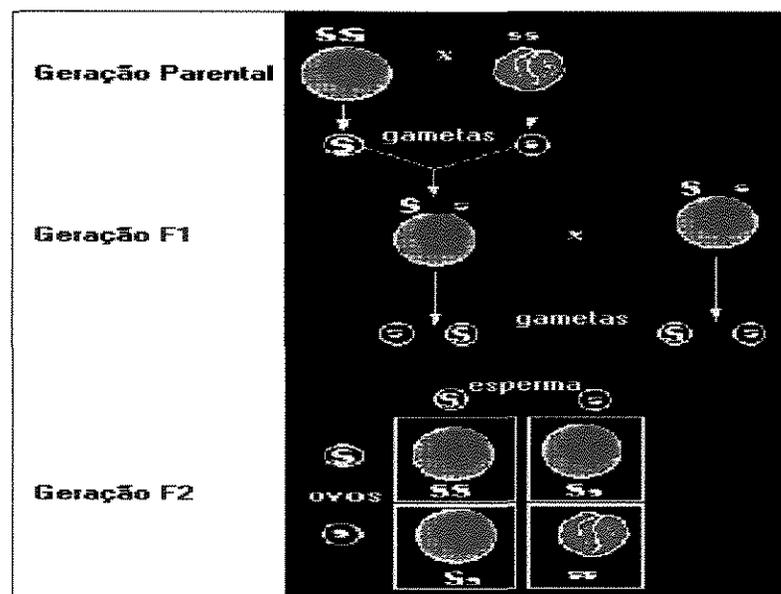


FIGURA 05 –Lei da segregação independente, onde as gerações filhas apresentam 50% do material genético herdado de cada genitor



- 3ª lei de Mendel ou lei da independência dos caracteres: Os *loci* de diferentes cromossomos recombina-se de forma independente e ao acaso após as divisões meióticas.
- Recombinação por *crossing-over*: Durante a meiose, os pares de cromossomos homólogos alinham-se colocando os alelos correspondentes lado a lado. Em pontos escolhido ao acaso, os cromossomos homólogos se quebram e trocam segmentos correspondentes, formando uma nova combinação de alelos diferentes das que herdamos (FARAH, 1997). Um indivíduo recebe integralmente 23 cromossomos do pai e 23 da mãe, mas para cada gameta produzido, ele não transmitirá integralmente o haplótipo paterno ou o materno, mas sempre uma mistura de ambos, mais especificamente uma combinação casual dos genes e *loci* que ele possuía, aumentando desta forma a variabilidade genética de uma população. (FIG. 06).

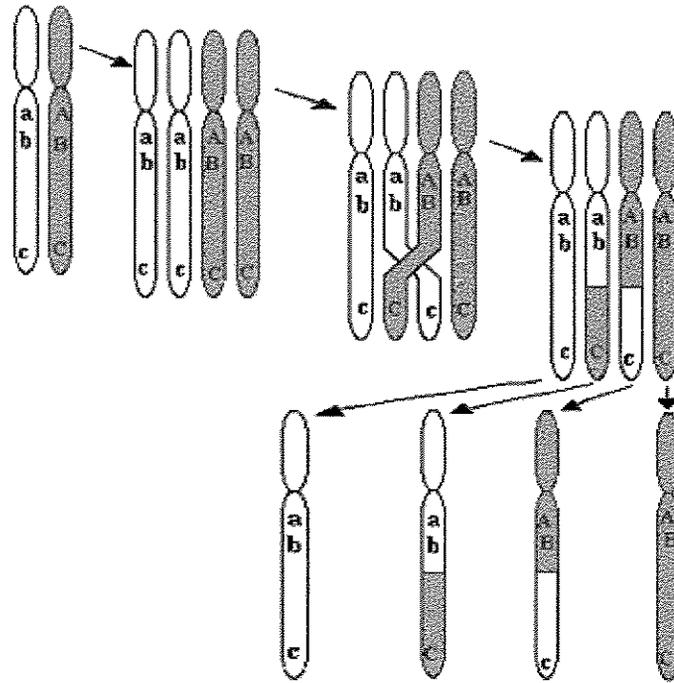


FIGURA 06 - Permuta ou *crossing over* entre os cromossomos homólogos durante a meiose, onde uma célula diplóide (2n) forma 4 gametas haplótipos (n) recombinados

- O fenômeno do equilíbrio de ligação: Quando se trata da análise de herança dos alelos em dois *loci* diferentes, mas em um mesmo cromossomo, eles só podem ser transmitidos independentemente, quanto mais eles distarem um do outro. Esta distância é denominada de equilíbrio de ligação e é medida em CentiMorgan, em homenagem ao geneticista Thomas Hunt Morgan que estabeleceu estas bases. Os *loci* são ditos sintênicos quando estiverem no mesmo cromossomo, mas segregarem de forma independente, devido à distância entre eles. Se, porém, estes *loci*



estiverem localizados próximos demais, os alelos destes dois sítios podem ser transmitidos conjuntamente, ocorrendo o evento chamado de desequilíbrio de ligação, ocorrendo o desvio da herança independente postulada por Mendel. Exemplo: O complexo de proteínas Cc/Dd/Ee do fator Rh sangüíneo.

- Presença em homologia do material genético: A manifestação morfológica ou fenotípica depende da interação genotípica dos dois alelos (um em cada cromossomo homólogo) para um determinado *locus*, ou do conjunto deles. Quando um indivíduo apresenta dois alelos idênticos para uma dada região genômica, diz-se que ele é homozigoto para aquele *locus*, se porém, o mesmo apresentar dois alelos diferentes, diz-se que ele é heterozigoto (THOMPSON, 1993; JOBIM *et al.*, 1999). Este sistema diplóide, onde os cromossomos apresentam-se em duplicata, diminui a possibilidade de se manifestar uma dada anomalia em um híbrido ou heterozigoto, contribuindo para a perenidade da espécie.

- Lei de Hardy-Weinberg: A investigação das leis que governam a estrutura genética das populações naturais ganhou seu mais firme fundamento com os achados, quase simultâneos, de Godfrey

Harold Hardy, matemático inglês, e Wilhelm Weinberg, médico alemão, onde se dizia:

“As frequências gênicas não se alterarão e as proporções genotípicas atingirão um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação entre si ao longo do tempo” (BEIGUELMANN, 1996).

Esta lei tem sua aplicação perfeita somente nos casos em que uma população obedeça às seguintes premissas: apresentar o mesmo número de homens e mulheres, ser infinitamente grande, todos os casais da população devem ser igualmente viáveis nem estar sobre pressão seletiva, todos os indivíduos serem férteis, não existir sobreposição de gerações nem mutações genéticas e, principalmente, a população estar em panmixia, isto é os casamentos devem ocorrer por acaso, não deve haver preferências por casamentos consangüíneos, nem por um tipo de perfil genotípico, nem por estratificação social.

A lei de Hardy-Weinberg (HW) é comumente utilizada para estabelecer se uma determinada população está em equilíbrio genético. Se os alelos correspondentes a um conjunto de *loci* são



independentes e identicamente distribuídos na população, esta população pode ser considerada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), ao contrário disso, quando houver desproporções nesses índices destes padrões, principalmente em populações sub-estruturadas ou populações onde ocorrem endogamias (como na Índia), dizemos que esta população está em desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

A importância desses estudos está na validade dos dados de tabelas de frequências alélicas e suas aplicações em determinações de vínculo genético e de identificação, desde que estejam em equilíbrio genético.

1.3.4 Divisão funcional do genoma

São as proteínas as responsáveis, sobretudo, pela expressão de um gene, bem como pelas nossas características físicas e fisiológicas, seja assumindo uma função metabólica, seja uma função estrutural ou enzimática. As regiões do DNA, que codificam proteínas são ditas codantes, correspondendo biologicamente aos genes e no mapa físico aos exons (THOMPSON, 1993; FARAH, 1997; LEWIN, 2000). O homem

apresenta cerca de 3,1 bilhões de seqüência de nucleotídeos e aproximadamente 39 mil genes, correspondendo a apenas 2 a 3% do genoma (STIX, 2001; MENCONI, 2001). Quase 70% do genoma é composto por DNA extragênico de seqüências simples, e entre 25% a 30% é constituído de DNA repetitivo e altamente repetitivo (FIG. 07) (HERMANN & HUMMEL, 1994; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; FARAH, 1997; JARRETA, 1998;).

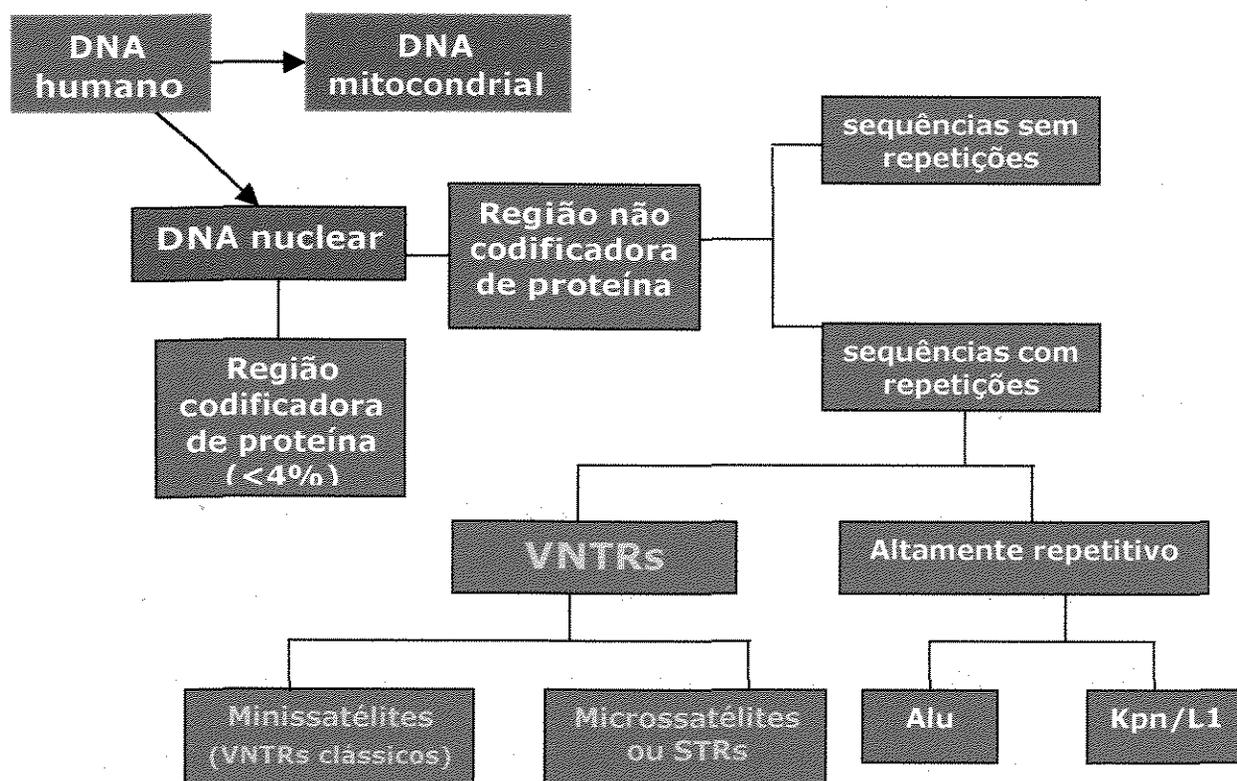


FIGURA 07 – Disposição do genoma

As mutações são a principal causa das diferenças genéticas encontradas entre indivíduos de uma mesma espécie.



Quando uma mutação interfere na atividade de regiões codantes (exônicas) do DNA, o indivíduo fatalmente estará sujeitos aos mecanismos da seleção natural. Contudo, as regiões não-codantes não estarão. Desta forma, as diferenças de seqüências entre essas regiões, nos indivíduos em geral, são muito mais freqüentes e notáveis. Essas variações, chamadas de polimorfismos, podem ser de origens diversas, desde uma simples troca de bases, uma inserção ou deleção de um ou vários nucleotídeos em uma dada seqüência (FIG. 08), ou variação do número de seqüências repetitivas entre segmentos homólogos por *crossing over* desigual. As variações existentes entre haplótipos, em determinada região, consistem geralmente de uma simples troca de bases, e são caracterizadas por sutis diferenças entre as seqüências comparadas, resultantes de mutações por ponto, por deleção ou por inserção casual. Todavia as diferenças mais relevantes para as finalidades discriminatórias estão nas regiões de DNA repetitivo, por apresentarem taxas de mutação maiores, padrões de diferenciação ou polimorfismos mais relevantes baseados em VNTR, isto é, a variação do número de repetições consecutivas da unidade repetitiva. Estas regiões apresentam taxas de

recombinação cromossômica e *crossing over* desigual (FIG. 09) bem maiores, gerando um maior número de alelos, isto é, de formas variadas para um *locus*.

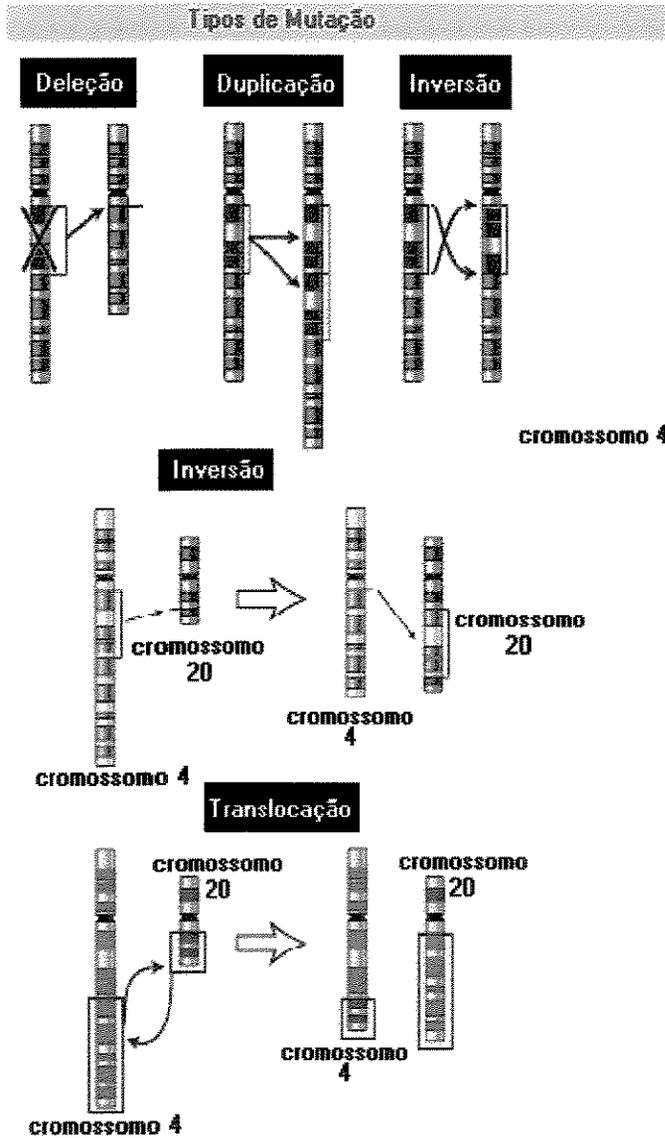


FIGURA 08 – Exemplos de tipos de mutação em cromossomos

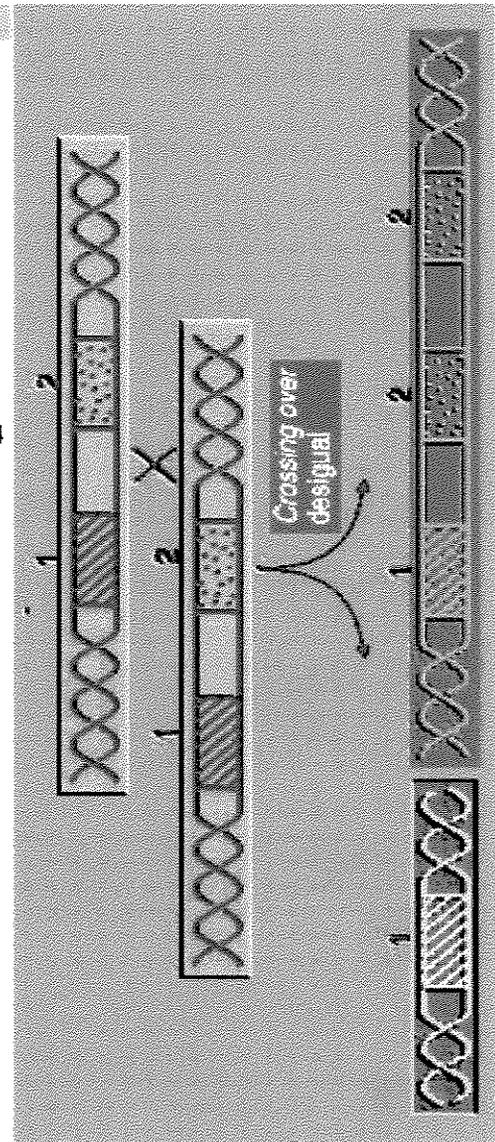


FIGURA 09 – *Crossing over* desigual em seqüências repetitivas, gerando grande número de alelos alternativos



Tecnicamente para se detectar estes polimorfismos, usa-se, por exemplo, o método de análise de tamanho dos fragmentos de DNA cortados por enzimas de restrição (RFLP). Os RFLP são polimorfismo de ponto, que criam ou abolem sítios de restrição, ou podem ser polimorfismo de tamanho que identificam unidades de repetição consecutivas de número variável (VNTR) (FIG. 10), ou de inserção de uma dada seqüência, como as seqüências altamente repetitivas *Alu* de 300pb, as quais aparecem mais de 300.000 vezes no genoma (FIG 11).

Seqüências repetitivas são encontradas: agrupadas uma após outra, isto é, *em tandem*, ou dispersas ao longo do genoma nuclear, em ambos formando sítios altamente variáveis em termos estruturais, isto é, altamente polimórficos ou hipervariáveis.

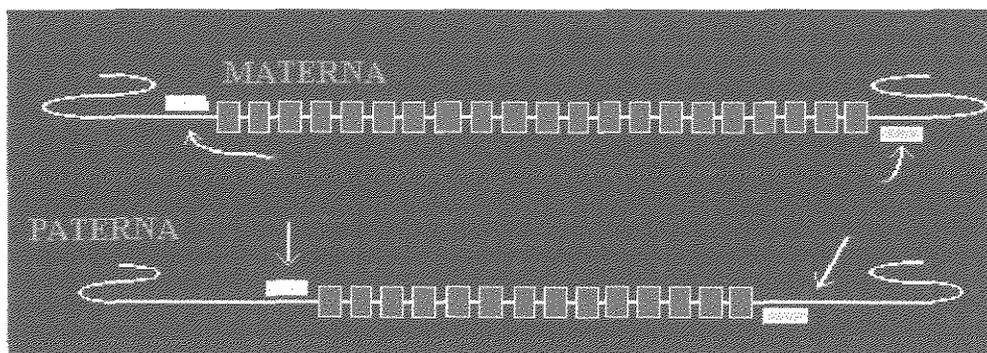


FIGURA 10 – Polimorfismo de VNTR onde um alelo apresenta mais unidades de repetições do que outro em um mesmo *locus*

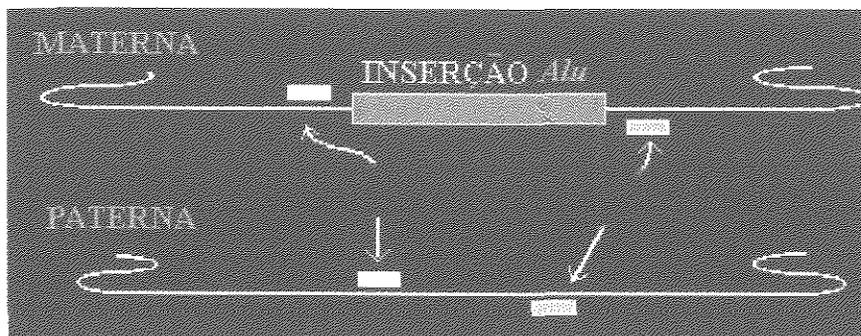


FIGURA 11 – Polimorfismo de inserção onde um dos alelos apresenta-se com inserção de uma sequência *Alu* em um mesmo *locus*

Desde que, em 1957, a União Soviética lançou o Sputnik, o primeiro satélite artificial a entrar em órbita, e em 1961 o cosmonauta Yuri Gagarin retornar do espaço, a expressão satélite ganhou notoriedade, a ponto de, por analogia, o termo DNA satélite passar a ser designado para denominar as seqüências repetitivas em *tandem*, uma vez que estas formam frações ou picos diferenciados (satélites) em relação aos do DNA genômico remanescente, quando submetidas à centrifugação de alta densidade com cloreto de cério (HERMANN & HUMMEL, 1994). Estas seqüências possuem densidades próprias, devido a uma proporção de bases G-C diferente do resto do genoma. (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; LEWIN, 2000). A categoria satélite ou de seqüências *em tandem* é subdividida em: satélite, minissatélite e microssatélite (MOUNT, 2000).



O DNA satélite é o principal obtido na separação por gradiente de cloreto de céσιο, sendo seqüências maiores de unidades de repetições de mais de 100pb. Um bom exemplo de DNA satélite são as seqüências alfoídes, caracterizadas por unidades de repetições de 171pb, que se repetem *em tandem* e encontram-se nos centrômeros de todos os cromossomos humanos (THOMPSON, 1993). Outras seqüências de DNA satélite formam blocos de heterocromatina nos braços longos dos cromossomos 1, 9, 16 e Y, sem nenhuma atividade aparente de transcriçãõ (FARAH, 1997).

O DNA minissatélite apresenta unidades de repetições de 15 até 100pb, com fragmentos que variam de menos de 600 a 25000pb (SILVA & MOURA-NETO, 1998a), repetindo-se diversas vezes em um dado local ou *locus*. Os minissatélites estão dispersos por todo o genoma, constituindo vários *loci* em diferentes cromossomos, com um padrão altamente polimórfico de indivíduo para indivíduo. O primeiro minissatélite descrito foi de autoria de JEFFREYS e colaboradores em 1985, caracterizada por uma seqüência de 33pb repetida quatro vezes, derivada de um íntron

do gene de mioglobina humana (JEFFREYS, 1985; HERRMANN & HUMMEL, 1994; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Existem diversas famílias de minissatélites já caracterizadas para a individualização humana, constituindo-se em excelentes marcadores genéticos para RFLP ou ainda para PCR, embora a função fisiológica dessas seqüências ainda não é bem conhecida ainda (JOBIM *et al.*, 1999).

Os microssatélites ou repetições consecutivas curtas (STRs) são constituídos por unidades repetitivas de 2 a 7pb, abundantemente presentes pelo genoma, com fragmentos que variam de 100 a 500pb. Atualmente as análises de microssatélites apresentam inúmeras vantagens sobre os minissatélites, por apresentarem um sistema bem sofisticado de automação, tempo de resultado sensivelmente mais curto, menores taxas de mutação e possibilidade de tipagem mesmo de amostras bem degradadas, pois baseia-se na reação em cadeia da polimerase ou PCR (RASKIN, 1998).



1.3.5 Principais técnicas em DNA para individualização

Qualquer que seja a técnica identificatória, não existe um resultado efetivo sem que haja dois elementos fundamentais: a evidência e o objeto de comparação. Em casos criminais, a evidência é o material biológico encontrado em um local de crime e o objeto de comparação é o acusado de ter praticado o delito ou a própria vítima. Em análises de vínculo de parentesco, em especial em investigação de paternidade, a evidência é o filho concebido fora da sociedade conjugal e o objeto de comparação é o suposto pai biológico.

A partir de uma pequena amostra biológica, o DNA permite uma análise minuciosa e individual dos caracteres de uma pessoa, baseada, sobretudo, em seu perfil genético, inclusive a análise do sexo biológico. Ao mesmo tempo, tem a capacidade de estabelecer vínculos de parentesco entre diferentes amostras biológicas. Estas são as duas maiores propriedades utilizadas na análise probatória da individualização e identificação humana em genética forense.

Existem diversas técnicas de identificação pelo DNA, como a amplificação dos fragmentos de polimorfismo de comprimento pela técnica da reação em cadeia da polimerase (AmpFLP), também chamada de amplificação das repetições seguidas de números variados (VNTR por PCR), as técnicas de *Dot Blotting*. Contudo, as técnicas de restrição dos fragmentos de polimorfismo de comprimento (RFLP) de minissatélites (VNTR por RFLP) e de PCR de microsatélites (PCR de STR), sem dúvida alguma, são as técnicas mais comumente utilizadas em genética forense.

Segundo ALVES, em 2000, historicamente a evolução na área de identificação de indivíduos pode ser dividida em duas fases: a fase pré-DNA e a fase pós-DNA.

Na fase pré-DNA as análises eram feitas de maneira indireta e através de marcadores protéicos, empregando reações imuno-específicas, antígeno-anticorpo. Pensando-se que as análises de proteínas refletem a utilização indireta de regiões codantes-funcionais do genoma, isto é, menos de 5% do genoma era explorado, a utilização das técnicas em DNA possibilitou um exorbitante aumento potencial, e direto, na utilização dos mais de



3 bilhões de nucleotídeos do genoma, principalmente das regiões satélites hipervariáveis.

A fase pós-DNA teve seu marco no final da década de 1970, com a descoberta da endonuclease (enzima) de restrição *HindII* que cortava o DNA em determinados sítios específicos do genoma. Smith e Wilcox isolaram esta endonuclease da bactéria causadora da meningite *Haemophilus influenzae*, a qual se utilizava dela nos seu mecanismo de defesa, digerindo DNA estranho ou invasor independente da espécie (LEWIN, 2000). Atualmente a biologia molecular é totalmente dependente da capacidade de se cortar o DNA em sítios específicos. As diferenças individuais existentes nos perfis dos fragmentos obtidos, após a digestão pela enzima de restrição, é que servem de base para a aplicação de uma das principais técnicas em DNA na individualização humana, as técnicas de RFLP. O polimorfismo no tamanho dos fragmentos por RFLP pode ser fundamentalmente de dois tipos:

- Mutação de um par na seqüência base de reconhecimento: cria ou abole um sítio de clivagem, formando fragmentos diferentes dos originais, ou seja, polimorfismos por RFLP.

- Deleção ou inserção de VNTR ou *crossing over* desigual: o polimorfismo resulta das diferenças observadas no número das sequências repetidas, decorrentes da alta variabilidade destas regiões do genoma (regiões hipervariáveis) durante a segregação reprodutiva.

A utilização dos minissatélites baseia-se principalmente nas técnicas de VNTR por RFLP. Já a utilização dos microssatélites, também conhecidos por pequenas repetições seguidas (STR), é baseada fundamentalmente nas técnicas de reação da polimerase em cadeia, ou PCR. A PCR nada mais é, que um método de clonagem artificial e *in vitro*, onde regiões alvos (FIG. 12), geralmente pequenas, são amplificadas de forma exponencial e geométrica até visualmente serem reconhecidas por algum sistema de coloração, seja manual ou automático. O polimorfismo é observado graças às diferenças de peso molecular entre os fragmentos da região-alvo amplificada, decorrentes das pequenas repetições em *tandem*, ou STR, uma espécie de VNTR de microssatélites.

Núcleo

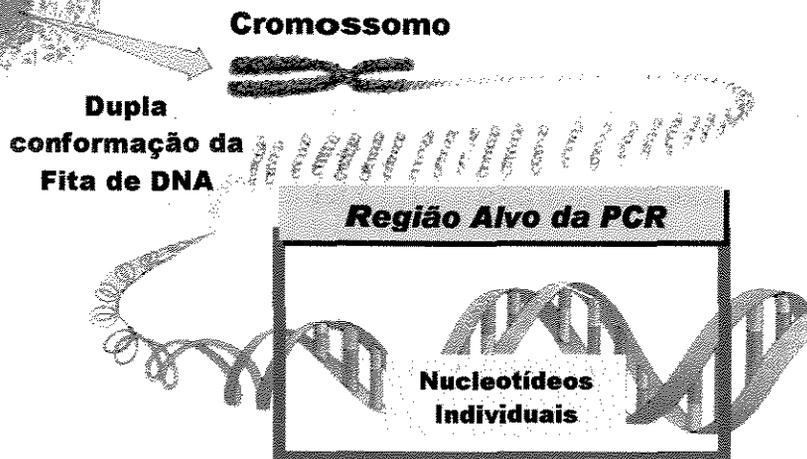


FIGURA 12 – Escolha de uma região alvo para a PCR

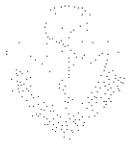
1.3.5.1 RFLP de minissatélites (VNTR)

São as técnicas mais tradicionais empregadas atualmente. Desde seu advento em 1985, quando JEFFREYS *et al.*, 1985a, resolveu uma disputa sobre imigração na Inglaterra.

A estratégia do método é a caracterização de regiões hipervariáveis (VNTR), após digestão com endonuclease de restrição, utilizando-se com sondas após *Southern blot* (JEFFREYS, 1985b; COMMITTEE...1992; CALABREZ, 1997; FARAH, 1997; MOURA-NETO, 1998a; SOARES-VIEIRA, 1998; ALVES, 2000; OZAKI, 1999). A técnica consiste na digestão do material genético com enzima de restrição, as quais servem como tesouras

biológicas na cisão específica do genoma. Os fragmentos de DNA obtidos são então submetidos a eletroforese em gel de agarose de acordo com seu tamanho molecular. São então desnaturados, isto é, separa-se a dupla fita do DNA, neutralizados e transferidos para membrana de nitrocelulose ou náilon, por capilaridade. Em seguida, o DNA é hibridizado com sondas contendo marcadores luminescentes, sejam radioativos ou enzimáticos, complementares às seqüências alvos, e então submetidos à auto-radiografia. Dada a luminescência dos marcadores, eles sensibilizam a película radiográfica, fornecendo desta forma o padrão de peso molecular (CALABREZ, 1997; JOBIM *et al.*, 1999).

A hibridização pode ser realizada por sondas multilocais, que se complementam em diversos *loci*, ou por sondas unilocais, que se complementa em um certo *locus*. As primeiras hibridizam diversos locais ao mesmo tempo, permitindo a detecção de inúmeras bandas de DNA na mesma etapa, geralmente um padrão de mais de 20 bandas em uma radiografia. Por este motivo, esta técnica foi denominada de DNA *fingerprints*, isto é, impressão digital do DNA, por apresentar inúmeras informações em uma



única etapa, tal qual uma impressão digital dactiloscópica e o código de barras, rotineiramente utilizado pelo comércio. Já as sondas unilocais também utilizam a mesma metodologia, mas identificam um *locus* de cada vez, o que permite observar com maior simplicidade os alelos de origem paterna e os de origem materna.

As sondas unilocais apresentam diversas vantagens em relação às multilocais, por exemplo, apresentam maior simplicidade de interpretação, são mais específicas na hibridização, permitem a utilização da regra da multiplicação no processo de cálculo do índice de paternidade, apresentam menos susceptibilidade às mutações e demandam menor quantidade de DNA, o que pode ser muito importante em casos com pouco material biológico disponível (COMMITTEE, 1992; FARAH, 1997; JOBIM *et al.*, 1999). Por exemplo, na técnica de RFLP, o limite de detecção das sondas multilocais é de aproximadamente 50ng, enquanto que as sondas unilocais este limite é menos da metade das anteriores. Atualmente, o padrão de sondas universalmente aceito são as sondas unilocais, sendo que em vários países

européus o uso das multilocais hoje é proibido (WHITTLE, 1996; JARRETA, 1998).

As análises RFLP são bastante discriminatórias, robustas e poderosas para testes de paternidade e em análises forenses (PENA, 1995). De uma maneira geral, os testes que analisam os minissatélites individualmente, isto é, que se utilizam das sondas unilocais, são aceitos internacionalmente como os métodos mais informativos, podendo-se estudar vários *loci* em seqüência, bastando para isso utilizar a mesma membrana para novas hibridizações (JOBIM *et al.*, 1999). Apesar das inúmeras vantagens desta técnica, o processo de análise por RFLP é bastante demorado, levando em média mais de duas semanas para sua conclusão, devido à exigência de tempo de algumas etapas, como a eletroforese em baixa voltagem, o processo de capilaridade para a membrana e a quimioluminescência para a auto-radiografia. Outras desvantagens são: a baixa resolução entre alelos com pequenas diferenças de tamanho, acarretando imprecisão na classificação do alelo, e a exigência de quantias mínimas de 10-



50ng de DNA puro e de boa qualidade, isto é, de alto peso molecular, comumente inviável em casos criminais.

1.3.5.2 PCR de microssatélites (STR)

A descoberta da reação em cadeia da polimerase, em 1985, rapidamente mudou os rumos da engenharia genética, inclusive proporcionando o desenvolvimento de novas técnicas de análises em DNA a partir de minúsculas quantias de material biológico (MULLIS, 1990; DECORTE, 1993).

As seqüências alvos da reação em cadeia da polimerase são regiões hipervariáveis compostas de pequenas repetições consecutivas (STRs), as quais podem ser amplificadas exponencialmente *in vitro*, graças à propriedade de replicação do DNA (DECORTE, 1993).

A técnica de PCR consiste na amplificação *in vitro* utilizando a reação enzimática catalisada pela DNA polimerase. Inicialmente utilizada, a *Klenow* DNA polimerase proveniente de *Escherichia coli* representou o início da implantação das técnicas de PCR, contudo devido à sua susceptibilidade térmica, era necessária a adição de nova quantidade de enzima a cada ciclo. A

Klenow polimerase, além disso, apresentava baixa especificidade co-amplificando outros fragmentos com a região-alvo, exemplificada pelos experimentos de amplificação da β -globina de SAIKI *et al.*, 1988. A utilização da *Taq* DNA polimerase possibilitou inúmeras melhorias na especificidade e estabilidade da reação (SAIKI *et al.*, 1988; CALABREZ, 1997). A *Taq* DNA polimerase é uma enzima termoestável e dependente de íons magnésio. É extraída a partir de um gene de 2499pb da alga *Thermus aquaticus* (*Taq*), contém 832 aminoácidos e é clonada e expressa em *E. coli*. Além da termoestabilidade, apresenta outra importante propriedade: a fidelidade de polimerização *in vitro* de aproximadamente 1 erro em cada 300 a 2000 nucleotídeos incorporados corretamente na cadeia. A atual metodologia de PCR é totalmente dependente da *Taq* polimerase, e ocorre em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão, formando um ciclo.

A desnaturação é o processo de separação da dupla fita à temperatura entre 90-95°C. Para que a hibridização ocorra, tem-se a necessidade de adição de iniciadores (*primers*) com a finalidade de demarcar as extremidades do DNA a ser amplificado,



tanto pela fita *sense* como pela *non-sense* do DNA. Os iniciadores são pequenos fragmentos de 20 a 30 nucleotídeos sintetizados com base na seqüência de DNA a ser flanqueada (SCHUTZBANK & STERN, 1993). A hibridização dos iniciadores ocorre nas duas fitas de DNA, a temperaturas que variam entre 45 e 65°C (OZAKI, 1999). A extensão ocorre a uma temperatura em torno de 72°, que é a temperatura de atividade máxima da *Taq*, incorporando os nucleotídeos seqüencialmente aos iniciadores, formando novamente a fita dupla, este processo é denominado polimerização. Os segmentos assim formados servem de molde para os ciclos subseqüentes, sendo por isso considerada uma reação em cadeia. O número de ciclos varia entre 20 a 30 (OLIVEIRA, 2001). Teoricamente após 20 ciclos tem-se mais de 1 milhão de cópias (MULLIS, 1990) .

Existem vários métodos para a identificação do produto amplificado pela PCR, dentre eles podemos salientar a técnica de hibridização alelo-específico (ASO), similares às técnicas de RFLP, mas sem a utilização das enzimas de restrição (DECORT, 1993).

A análise dos tamanhos dos produtos da PCR pode ser também realizada diretamente no sistema eletroforético, por coloração de prata ou a detecção fluorescente da região de VNTR/STR, em especial pelos equipamentos automáticos de seqüenciamento.(OLIVEIRA, 2001; SHORT...2001).

Este método apresenta diversas vantagens em relação aos VNTRs por RFLP, enquanto nestes as quantias mínimas para se poder trabalhar são sempre maiores que 10ng, as técnicas de STR baseadas em PCR podem ser desenvolvidas com quantias menores do que 1ng (CALABREZ, 1997), sem que necessariamente tenha altas concentrações de DNA de alto peso molecular, tornando-se a técnica de eleição em casos onde o material encontra-se degradado ou em fase de decomposição ou esqueletização (HOFF-OLSEN, 1999). A classificação dos fragmentos, isto é, dos alelos é mais precisa, direta, menos propensa a mutações e não necessita de utilização de marcadores radioativos. Além disso, a rápida expansão do projeto genoma mundial e o surgimento de diversos mecanismos de automação nessa área beneficiaram enormemente este método, propiciando uma análise mais rápida, direta e



automatizada de diversos *loci* ao mesmo tempo, decorrentes do desenvolvimento de iniciadores *multiplex* para PCR e a utilização de seqüenciadores automáticos para a análise dos fragmentos (LORENTE, 1997). Também o tempo de obtenção dos resultados para estas técnicas chega a ser menos da metade quando comparadas com as sondas unilocais, e o melhor, sem que haja prejuízo no poder de prova, tornando-se atualmente no principal padrão internacional (JOBIM *et al.*, 1999; GRATTAPAGLIA *et al.*, 2000; RUITBERG, 2001; SHORT...2001).

Contudo vale salientar que as técnicas de STR por PCR apresentam algumas desvantagens. Todos os sistemas analisados por PCR são menos informativos, isto é, menos polimórficos, com um índice de heterozigose menor que os sistemas genéticos de VNTR baseados em RFLP (PENA, 1995), também a extrema sensibilidade da PCR resulta em uma alta susceptibilidade aos contaminantes externos, principalmente os próprios contaminantes gerados pelas amplificações anteriores ao evento, os chamados *amplicons* (WHITTLE, 1996).

2.1 Validação dos exames periciais

O ditado: "cavalo ganho não se olha os dentes" é uma analogia de estimativa de idade pelos dentes. Curiosamente, foi objetivo minucioso de pesquisa de MUYLLE et al., 1996, que desenvolveu uma metodologia a fim de se avaliar a validade científica da estimativa da idade pelos dentes em cavalos. Cientificamente e juridicamente, a validade e a admissibilidade de provas periciais sempre foram grandes preocupações dos peritos. A literatura mundial tem recebido diversas contribuições científicas das mais diversas áreas das ciências forenses, preocupadas com a validação de vários testes e provas periciais. O curso de pós-graduação em odontologia legal da Faculdade de Odontologia de Piracicaba tem contribuído com diversos métodos identificatórios alguns pioneiros no auxílio das ciências forenses, com especial atenção aos padrões de validade e aplicabilidade destas técnicas¹(DARUGE, 2000). COSTA (1998), preconizou uma técnica para a validação da estimativa do tempo de morte, baseada no

¹ DARUGE, E. (Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas)
Comunicação pessoal. 2000



resfriamento da temperatura corporal de 42 cadáveres, levando em consideração fatores externos como a temperatura. GALVÃO (1999) formulou um sistema computadorizado para estimativa da idade pelos dentes através de sistema computadorizado, utilizando-se de todas as tabelas dentárias de estimativa de idade então existentes, integrando-as simultaneamente para validação em aplicações práticas. REIS (1999), desenvolveu uma metodologia para padronização da identificação humana por comparação radiológica computadorizada de estruturas ósseas, visando demonstrar o valor pericial da análise. Uma criteriosa análise pericial do estudo comparativo histomorfológico do osso humano com de outros gêneros foi desenvolvida por RAMALHO (2000), visando diagnóstico fidedignos da espécie pelas características microscópicas. ALMEIDA (2000), desenvolveu um trabalho inédito de protocolo de identificação odonto-legal em desastres de massa, a fim de se obter resultados identificatórios mais confiáveis e de uma maneira mais efetiva. A preocupação em gerar uma metodologia para a validação jurídica das radiografias digitais foi amplamente discutida por SOUZA (2001).

As análises e provas em DNA, dada a versatilidade, tem aplicações incríveis como a identificação pela análise das células de dentes degradados (HANAOKA *et al.*, 1998), de tecidos humanos decompostos (HOFF-OLSEN, 1999), de ossos recentes (ALVES, 2000), de filtros de cigarro (HOCHMEISTER, 1991), de artigos pessoais e vestuários (SASAKI, 1997), de esqueletos com milhares de anos através do uso do DNA mitocondrial (HOLLAND, 1993; HERMANN & HUMMEL, 1994), e até na solução de um caso para determinação da origem e sexo do sangue de uma estátua da Virgem Maria em 1998 (PALMIRATTA, 1998). Estes exames, apesar de complexos, nada mais são do que mais um tipo de sistema que tem conquistado sua validade e aplicabilidade, principalmente porque são viáveis cientificamente (*PENA, 2000).

2.1 Biologia Molecular

Mendel, pelo pioneirismo em oito anos de pesquisa com cruzamentos de ervilhas, é considerado o pai da Genética (FIG. 13). Involuntariamente, em 1868, em função de sua eleição para abade, encerrou precocemente a sua carreira. Seus excepcionais manuscritos permaneceram esquecidos por mais de 30 anos.

Quando William Sutton e Theodor Boveri estabeleceram a localização dos genes nos cromossomos, as conclusões póstumas de Mendel receberam a devida relevância científica (HAUSMANN, 2000), derrubando conceitos arcaicos, os quais preconizavam que a transmissão hereditária se dava pela mistura de humores, mais precisamente pelo sangue (SIMAS FILHO, 2000).

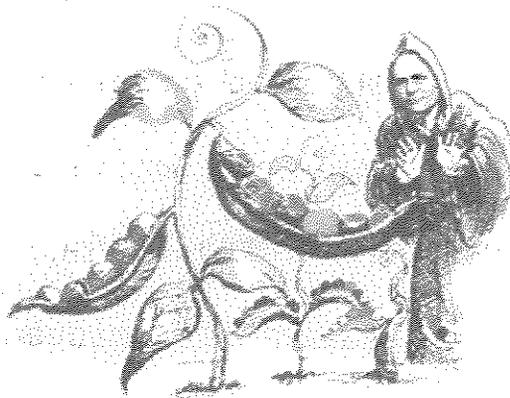


FIGURA 13 – Ilustração de Mendel e suas ervilhas

Em 1900, Karl Landsteiner, um médico alemão, inaugurou a utilização da genética nas ciências forenses, ao descobrir que existiam certas substâncias (antígenos) nos glóbulos vermelhos humanos, que eram transmitidas a seus descendentes, ao sistema ele denominou ABO (DARUGE JÚNIOR, 1998), rendendo-lhe o prêmio Nobel em 1930 (HAUSMANN, 1997).

No Brasil, o exame de sangue pelo sistema ABO foi realizado pela primeira vez em 1927, em São Paulo (MARTINEZ, 1998). No mesmo ano, Landsteiner e Levine ampliaram o leque de opções dos exames sangüíneos, descobrindo outro sistema: o MN (BEIGUELMAN, 1995). Em 1941, Landsteiner e Wiener injetando hemácias obtidas de sangue de *Macacus Rhesus* em coelhos e cobaias, constataram a formação de um soro que aglutinava as hemácias desses animais, sendo que a substância responsável pela aglutinação recebeu o nome de fator Rh, estava descoberto mais um sistema por Landsteiner e a possível causa da eritroblastose fetal (DARUGE, 1976). Quando a hereditariedade dos tipos sangüíneos foi estabelecida como verdade científica, logo a sua aplicação prática foi reconhecida, pois a análise e determinação dos tipos sangüíneos podiam discriminar com certeza, quem não podia ser o pai de uma criança. Entretanto, somente na década de 60, isto é, mais de 60 anos após a descoberta original, os grupos sangüíneos foram aceitos como evidência legal nos Estados Unidos (SIMAS FILHO, 2000).



Desde da descoberta dos sistemas ABO, muitos outros sistemas eritrocitários foram paulatinamente se incorporando à literatura científica, tais como: Kell, Duff, Kidd, MN, Ss, Rh, boa parte deles descobertos pelo próprio Landsteiner. Todos eles eram baseados nas proteínas das células vermelhas do sangue, ou seja, as hemácias. Posteriormente, descobriu-se uma nova gama de indicadores genéticos, representados pelos sistemas enzimáticos eritrocitários, ou grupos séricos, presentes na parte líquida do sangue, o soro, sendo as mais utilizadas as determinações de haptoglobinas (Hp) e fosfoglicomutase (PGM) (CALABREZ, 1997; SIMAS FILHO, 2000).

A descoberta de mais um sistema, os antígenos leucocitários, foi um dos principais coadjuvantes de uma maior admissibilidade dos marcadores genéticos perante os tribunais. Deve-se creditar, sobretudo, o grande desenvolvimento destas técnicas aos estudos minuciosos realizados pela medicina, na área de transplante de órgãos (JOBIM *et al.*, 1999). Sabe-se hoje que os maiores responsáveis pelas rejeições de transplantes não são os eritrócitos, mas os leucócitos, notadamente os linfócitos. Este

complexo de antígenos leucocitários, ficou estabelecido em 1975 como Sistema do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) (SIMAS FILHO, 2000).

Entretanto, pelo menor grau de especificidade e por sua efetividade estarem quase que totalmente restritas ao material biológico sangue, estas técnicas mencionadas têm sido substituídas pelos testes de DNA. Em 1999, HENKE comparou o polimorfismo dos testes de vínculo genético em 24 sistemas diferentes de marcação, desde os marcadores ditos clássicos (ABO, MN e Rh), até os minissatélites e microsatélites de DNA, concluindo que os marcadores mais informativos eram os minissatélites, apesar de nenhum deles serem totalmente estáveis, uma vez que todos estão predispostos às mutações.

No início da década de 80, Ray White descreve o primeiro marcador RFLP polimórfico (SHORT...2001). Na metade da década de 80, surgiram métodos para a tipagem do ácido desoxirribonucléico (DNA), isto é, para mostrar diferenças peculiares do próprio material genético. O primeiro método de identificação baseou-se em RFLP de minissatélite, hibridizada com



uma sonda *multilocus* derivada de um íntron do gene da mioglobina humana (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). O método analisava seqüências VNTR de 33pb em vários *loci* do genoma (JEFFREYS *et al.*, 1985b; HERRMANN & HUMMEL, 1994).

O primeiro caso de paternidade através da tipagem de DNA, em 1985, não foi uma paternidade, mas um reconhecimento de maternidade relacionado com um problema de imigração na Inglaterra, de um garoto proveniente de Gana. (JEFFREYS *et al.*, 1992; JARRETA, 1998; MOURA-NETO, 1998b):

"Este primeiro teste prático de DNA só aconteceu após dois anos de luta da inglesa Christina Sarbah e seu filho de origem africana Andrew. O objetivo era provar para a embaixada inglesa que eles eram de fato mãe e filho. Em 1983, após passar um longo tempo em Gana com sua mãe Christina e o marido desconhecido, Andrew, então com 13 anos, desembarcou com sua mãe na Inglaterra, sendo então impedidos de saírem do aeroporto de Heathrow pelo Departamento de Imigração Inglesa. A alegação era de que os passaportes estavam forjados e que novos passaportes deveriam ser providenciados. Muitos advogados ofereceram ajuda para Andrew, que possuía muitas evidências de realmente ser filho de Christina, incluindo fotografias e declarações de

outras pessoas. Vários testes de comparação de fenótipos foram realizados, como as baterias de tipagem sanguínea e HLA, indicando que Christina era mãe de Andrew. Porém, todos os testes realizados podiam apresentar um falso-positivo, já que as irmãs de Christina, de nacionalidade africana, eram também suspeitas de ser a mãe biológica de Andrew. Diante da dúvida, todas as evidências a favor de Andrew foram rejeitadas. Ao saber do caso, Dr Jeffrey's aceitou fazer o teste de DNA *fingerprints*, sendo uma excelente oportunidade para testar a sua nova tecnologia. Foram coletadas amostras de sangue de Christina, Andrew e seus três irmãos, além de um indivíduo que não possuía relação de parentesco. Após a comparação entre todos os indivíduos concluiu-se que Andrew realmente era filho de Christina. O caso foi muito complicado devido o suposto pai não ter sido testado e sendo assim, o DNA *fingerprints* do pai foi reconstruído a partir do DNA dos irmãos de Andrew. O resultado foi finalmente aceito pela corte inglesa" (JEFFREYS *et al.*, 1985a).

Interessante solução teve o primeiro caso de identificação criminal através de exames de DNA, ocorrido em 1985, na Inglaterra (CALABREZ, 1998; MOURA-NETO, 2000):

"No pequeno condado de Leicestershire, uma mulher foi estuprada e assassinada. O próprio



Doutor Alec Jeffreys, que residia na mesma cidade, colheu o esperma encontrado na vítima e realizou a tipagem do DNA. Na recorrência de outro crime similar, Jeffreys observou tratar-se do mesmo homem que cometera o primeiro crime. As autoridades locais forjaram uma campanha de doação de sangue, mas sem nenhum sucesso na comparação com o padrão de DNA do estuprador. Com a desconfiança recaindo sobre um viajante no condado, este foi convidado a doar sangue, e após a tipagem do DNA no sangue colhido, pelo método de sonda multilocus por RFLP, Jeffreys concluiu que o código genético do viajante era o mesmo do estuprador” (²GENOMIC...2001).

Em 1985, após os trabalhos desenvolvidos pelo Dr. Jeffreys, iniciou-se o uso da tipagem do DNA em amostras forenses no Reino Unido, EUA e Canadá. Surge o termo DNA *fingerprint* ou “impressão digital do DNA” indicando a idéia de identificação absoluta (MOURA-NETO, 1998b).

Em uma sexta feira à noite, do mês de abril de 1983, quando serpenteava pelas sinuosas estradas que cortavam as montanhas californianas, o bioquímico Kary B. Mullis idealizou o que seria uma das descobertas mais importantes da biologia

² GENOMIC em: <http://www.genomic.com.br> [último acesso em mar/2001]

contemporânea. Em 1985, este "generalista com uma inclinação à química" (MULLIS, 1990) concretizou o seu grande invento, a reação em cadeia da polimerase (PCR), o que lhe rendeu o prêmio Nobel de Química em 1993 (HAUSMANN, 1997). Uma simples descoberta capaz de mudar radicalmente os rumos da atual biologia molecular.

Em 1989 aplica-se a metodologia de "impressões digitais de DNA" para determinação da paternidade de cavalos puro-sangue (JARRETA, 1998).

Em 1990 são descritos alguns STR de uso potencial em identificação genética. Em 1991, são publicados os primeiros artigos sobre amplificação de STR por PCR por EDWARDS *et al.*, POLYMEROPOULOS *et al.*, ZULIANI *et al.* e HEARNE *et al.*, em especial os STR de núcleo repetitivo trimérico e tetramérico (THOMPSON *et al.*, 1998; BUDOWLE & MORETTI, 1999; SHORT...2001).

Em 1992, o Committee on DNA Technology in Forensic Science, após intensas reuniões, divulga normatizações para proporcionar segurança e confiabilidade nos padrões



metodológicos e sobre a interpretação da estatística populacional, em especial nos casos criminais (COMMITTEE...1992).

O matemático forense Charles Brenner propõe metodologias de cálculo de probabilidade em exames de paternidade nos casos onde a mãe não esteja disponível, baseando-se apenas no dueto: filho e suposto pai (BRENNER, 1992).

Desde 1992, o Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos (NIST), implanta programas de proficiência para laboratórios baseados em certificados de análise, válidos por alguns anos, utilizando-se de materiais de referência padrão, divididas em três tipos; uma para RFLP (NRM 2390) que foi o primeiro certificado a ser implantado, outra mais recente para PCR (NRM 2391a) e uma outra no sequenciamento mitocondrial (NRM 2392) (SHORT...2001).

A Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB) publica, em 1994, material propondo um modelo de cálculos aleatórios para índice de paternidade, probabilidade de paternidade e poder de exclusão, com ênfase para os casos de investigação de paternidade (AMERICAN...1998).

Em 1996, o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos (NRC) publica várias recomendações de interpretação de resultados baseadas na regra da multiplicação para *loci* que se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e estejam em equilíbrio de ligação, como as recomendações NRC-II 4.1, NRC-II 4.2, NRC-II 4.3, NR-II 4.4 (SHORT...2001).

WEIR *et al.*, em 1997, propuseram uma metodologia de cálculo nos casos de evidências com misturas de DNA, considerando inclusive a possibilidade de haver homozigose em vários *loci* em uma mistura de diferentes DNA (WEIR, 2001)

O Serviço de Ciências Forenses do Reino Unido (FSS) inicia um banco de dados de DNA de criminosos em 1995. Em 1998, o FBI lança o CODIS, que é um sistema de banco de dados de DNA bastante sofisticado contendo dados de evidências de amostras de crimes não resolvidos e dados de criminosos, principalmente os de casos de estupro (BUDOWLE & MORETTI, 1999; FEDERAL...2001).

DELGADO, 1998, propõe uma metodologia para cálculos estatísticos em paternidade onde não seja possível analisar o DNA de um demandado ou de um suposto pai, considerando, todavia, os seus pais biológicos, irmãos e/ou filhos legítimos como fonte de



informação genética, visando, sobretudo, a montagem da possível estrutura genética do demandado.

FUNG & HU, 2000, desenvolveram uma metodologia de cálculo de probabilidade para evidências com mistura de DNA ou contaminadas, baseada na recomendação NRC-II 4.1 do Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos.

Atualmente está existindo uma mudança no panorama das atuais técnicas moleculares com fins de identificação, onde as técnicas de STR por PCR vêm rapidamente se sobrepondo aos demais métodos (JARRETA, 1998). Uma das maiores mudanças tem ocorrido no direcionamento das atuais pesquisas e nas metodologias empregadas nos testes de proficiência e qualidade dos laboratórios forenses (MOURA-NETO, 2000; RUITBERG, 2001), como no último ensaio realizado pelo Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense (GEP-ISFG), onde somente seis dos 57 laboratórios que participaram do exercício utilizaram metodologia de VNTR por RFLP na resolução dos exames de paternidade, e mesmo assim como uma tecnologia adicional ao STR por PCR (GRATTAPAGLIA *et al.*, 2000). Comprovando este fato, em 1998, os 13 *loci* definidos pelo FBI

denominado *CODIS*, e adotados pela Interpol para a construção de bases de dados genéticos, são de tecnologia de STR por PCR (BUDOWLE & MORETTI, 1999; FEDERAL...2001; SHORT...2001). Um outro exemplo interessante foi a construção pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos Estados Unidos (NIST) de um complexo banco de dados, informações e literatura especializada, mas somente em tecnologia de STR por PCR (RUITBERG *et al.*, 2001; SHORT...2001).

Em 2000, quase que simultaneamente e com uma antecedência de mais de quatro anos ao inicialmente previsto, o Consórcio Mundial e a empresa Celera Genomics finalizam o seqüenciamento de 3,1 bilhões de nucleotídeos do genoma humano. Entre 31000 e 39000 genes são encontrados, aproximadamente 1/3 do que se esperava (EDWARD. 2000; JONES, 2000; MENCONI, 2001; STIX, 2001).

A validade científica destas técnicas encontra-se fartamente embasada em algumas centenas de publicações indexadas. Entretanto, há diversas normas de qualidade a serem respeitadas e numerosos aspectos a serem previamente analisados para o seu real valor jurídico, em especial quando se transporta ao âmbito criminal, onde as amostras biológicas encontradas, quase na sua totalidade, não apresentam condições ideais, e a coleta inúmeras vezes é feita de maneira totalmente inadequada.

O presente trabalho terá por finalidades principais:

- Analisar a idoneidade e a confiabilidade destas *novas técnicas*;
- Destacar etapas passíveis de erros e suas conseqüências técnicas, jurídicas e sociais;
- Colaborar na formação de opiniões mais conscientes e esclarecidas no assunto;

- 
- Sugerir medidas cautelosas para uma real e mais eficaz aplicabilidade destas técnicas.
 - Elucidar à sociedade aspectos técnicos fundamentais, como, por exemplo, a análise criteriosa dos estratosféricos índices de inclusão de identidade e de paternidade;
 - Sintetizar termos e siglas científicas, assim como de metodologias e técnicas mais usuais, para uma linguagem mais simples e inteligível ao público em geral, especialmente aos da área política, jurídica e policial.

O presente trabalho, em se tratando de um projeto especial (conforme normalização de dissertações da Faculdade de Odontologia de Piracicaba), não contará com materiais no seu aspecto físico, fundamentando-se em provas literárias amplamente publicadas, em revisão de metodologias de análise científica e estatística, e abordagem do grau de validade técnica e jurídico-social destas provas.

No cenário social, o presente trabalho constitui-se em um manual de análise dos padrões de validade e admissibilidade das provas em DNA e de revisão a conhecimentos moleculares essenciais. Para tanto, especialmente direcionado às pessoas não familiarizadas com a biologia molecular e genética forense.

Os resultados constituir-se-ão da pesquisa da legislação atual, em especial a legislação brasileira, e do real teor de valor jurídico dessas provas. Será formulado um conjunto de afirmações, resultantes de questionamentos e dúvidas mais cruciais e pertinentes ao assunto, conforme orientação jurídica de



³DARUGE, 2000. As respostas são direcionadas à obtenção de conclusões claras e objetivas, capacitando o leitor à melhor compreensão dos dados técnicos dessas análises e das nomenclaturas mais usuais.

Seguindo uma cronologia óbvia, os resultados serão expostos gradativamente, incluindo farta ilustração. Seguem-se as perguntas:

A. Perguntas de âmbito biológico:

- 1. O que a cultura popular acha a respeito dos exames em DNA?**
- 2. Quais as vantagens das técnicas em DNA sobre os outros sistemas protéicos?**
- 3. Como é feita a obtenção do DNA? Que métodos são mais confiáveis? Para cada material utiliza-se um determinado método?**
- 4. Como se interpreta as siglas de alguns marcadores genéticos usados em PCR e RFLP?**

³ Idem nota 1

- 5. Como interpretar a nomenclatura das enzimas de restrição?**
- 6. O que são "primers" e quais as propriedades que estes iniciadores devem ter?**
- 7. O que são as sondas de VNTR e como elas funcionam?**
- 8. Como é feito o diagnóstico de sexo e espécie?**
- 9. Quais as vantagens das técnicas de STR/PCR e VNTR/RFLP?**
- 10. Como são feitas as classificações dos alelos em RFLP e em PCR?**
- 11. Quantas sondas e quantos "loci" são necessários para fornecerem índices seguros de confiança?**
- 12. Como funcionam os sistemas "multiplex" para PCR?**
- 13. Quantas exclusões são necessárias nos diversos sistemas para se concluir um caso?**
- 14. Listar alguns dos elementos cruciais que podem ser empregados para avaliar a confiabilidade de um serviço de determinação de paternidade.**

15. Correlacionar fontes de erros com as consequências técnicas?

16. O que é o DNA mitocondrial? Como ele auxilia na genealogia humana?

B. Perguntas de âmbito estatístico:

17. A metodologia de análise e cálculo para investigação de paternidade é igual para identificação criminal?

18. O que é IP, W, PE? Para que eles servem?

19. Como são baseados os métodos de cálculo e probabilidade nos exames em DNA?

C. Perguntas de âmbito jurídico:

20. Quais dados devem obrigatoriamente estar presentes no laudo de teste de determinação de paternidade ou identificação?

21. O que é o DNA virtual para investigação de paternidade?

22. Como são realizados os controles de qualidade?

23. Se na constituição, está escrito que ninguém está obrigado a fornecer provas contra si mesmo, como se

analisa a intimação para fornecimentos de material biológico em um caso de investigação de paternidade ou mesmo de um caso criminal?

24. *Quais são os padrões de admissibilidade, aplicabilidade no Brasil para estes exames?*

25. *O que a lei prevê para estes exames? O que o governo pode fazer?*

26. *Seria adequado implantar um banco de dados de DNA com amostras de locais de crimes e de delituosos no Brasil?*

27. *Como o juiz deve interpretar uma perícia em DNA?*

28. *Comentar sobre o poder de utilidade de uma prova em DNA em detrimento do seu custo?*

A. Perguntas de âmbito biológico:

1. O que a cultura popular acha a respeito dos exames em DNA?

Interessante montagem realizou ⁴PENA (2000), onde sutilmente formulou alguns dos quesitos mais comumente comentados pela sociedade leiga. De forma sucinta adaptamos alguns deles:

a. "O exame de DNA têm de ser feito somente no sangue".

AFIRMAÇÃO FALSA, pois o DNA é o componente genético básico e está presente em todas as células do nosso corpo. Ele é absolutamente o mesmo nas células brancas do sangue, nas células da mucosa bucal, nas células da raiz do cabelo, no sêmen. O teste de paternidade pode ser feito com qualquer tecido que contenha DNA.

b. "Exame de DNA é sempre igual. Vamos fazer o mais barato".

AFIRMAÇÃO FALSA, pois infelizmente qualidade tem preço. O valor do exame está diretamente ligado à quantidade de regiões do DNA estudadas, à técnica empregada e ao percentual de confiabilidade do resultado.

⁴ PENA, S.D.J. (Núcleo de Genética Médica - GENE) **Correspondência trocada**. 2000



c. "O bebê é muito novinho e terá de crescer mais para fazer o teste de DNA".

AFIRMAÇÃO FALSA, tendo em vista que não existe uma idade mínima nem máxima para o teste de paternidade pelo DNA, pode-se inclusive realizar testes de DNA a partir de um simples esfregaço de bastonete na cavidade bucal.

d. "Cortei o cabelo dele para fazer o teste de DNA".

AFIRMAÇÃO FALSA, porque o cabelo cortado não contém DNA. O DNA usado para o teste está na raiz do cabelo arrancado, isto é, no bulbo capilar. Por si só, o fio de cabelo não tem valor probatório para os testes em DNA, pois é composto basicamente por proteínas como o colágeno e queratina, além de bolhas de ar.

e. "Ele já morreu há muitos anos e não deixou nenhum outro parente vivo. Não poderei nunca provar que ele era o pai de meu filho".

AFIRMAÇÃO FALSA, pois o teste de paternidade pelo DNA pode ser realizado em DNA extraído de material exumado, independente do tempo, local de sepultamento, da causa da morte. Entretanto existe uma importante regra de proporcionalidade: quanto melhor forem as condições físicas, químicas e biológicas do material a ser examinado, maior será a chance de se obter sucesso na análise.

f. "Sou primo da mãe e estou com medo do resultado ser positivo, mesmo que eu não seja o verdadeiro pai".

AFIRMAÇÃO FALSA, porque toda pessoa é geneticamente diferente da outra, exceto os gêmeos monozigóticos (idênticos). Um teste de paternidade bem feito é capaz de definir a paternidade mesmo se os supostos pais forem, por exemplo, pai e filho, ou irmãos, ou primos.

g. "Tomei medicamentos, me alimentei bem e bebi umas cervejinhas antes da coleta para o teste de DNA. Tenho certeza que o resultado não será o verdadeiro".

AFIRMAÇÃO FALSA, tendo em vista que nenhum medicamento, alimento ou bebida altera o nosso DNA. Não há nenhum preparo especial ou cerimônia para a coleta de sangue e/ou células bucais para os teste de paternidade pelo DNA.

h. "Terei de esperar o bebê nascer para provar quem é o pai dele".

AFIRMAÇÃO FALSA, pois não é necessário esperar o nascimento do bebe. O teste de paternidade pelo DNA pode ser feito ainda durante a gestação, através da análise do DNA das vilosidades coriônicas ou da amniocentese.



- i. "A mãe não precisa participar do exame porque já sabemos que ela é mãe mesmo".

AFIRMAÇÃO DUVIDOSA. Se ela já for falecida, o exame poderá ser feito sem ela, mas é mais dispendioso e mais difícil. Se a mãe for viva o ideal é testá-la também. Metade do DNA vem da mãe e a outra metade do pai. O teste sem a mãe fica sem informações importantes que têm de ser compensadas com o estudo adicional de um maior número de regiões do DNA do investigado (suposto pai) e do investigante (filho).

- j. "O DNA arquivado em um banco de DNA pode ser usado após a morte, caso apareçam pessoas pleiteando a paternidade".

AFIRMAÇÃO VERDADEIRA. Pessoas prevenidas que temem que, após o seu falecimento possam aparecer pessoas reclamando participação na herança, tomam esta providência. A realização deste ato, contudo, deverá ser devidamente comprovada, principalmente através de uma criteriosa documentação.

2. *Quais as vantagens das técnicas em DNA sobre os outros sistemas protéicos?*

Pelo menor grau de especificidade e por sua efetividade estarem quase que totalmente restritas ao material biológico sangue, as técnicas tradicionais têm sido substituídas pelos testes de DNA. As análises e

provas em DNA, dada a versatilidade, tem aplicações incríveis como a identificação pela análise das células de dentes degradados (HANAOKA *et al.*, 1998), de tecidos humanos decompostos (HOFF-OLSEN, 1999), de ossos recentes (ALVES, 2000), de filtros de cigarro (HOCHMEISTER, 1991), de artigos pessoais e vestuários (SASAKI, 1997), de esqueletos com milhares de anos através do uso do DNA mitocondrial (HOLLAND, 1993; HERMANN & HUMMEL, 1994). Em 1999, HENKE comparou o polimorfismo dos testes de vínculo genético em 24 sistemas diferentes de marcação, desde os marcadores dito clássicos (ABO, MN e Rh), até os minissatélites e microssatélites de DNA, concluindo que os marcadores mais informativos eram os baseados em DNA. Além do mais, a partir de uma pequena amostra biológica, o DNA permite uma análise minuciosa e individual dos caracteres de uma pessoa, baseada, sobretudo, em seu perfil genético, inclusive a análise do sexo biológico. Ao mesmo tempo, tem a capacidade de estabelecer vínculos de parentesco entre diferentes amostras biológicas. Estas são as duas maiores propriedades utilizadas na análise probatória da individualização e identificação humana em genética forense. O seu uso tem-se expandido também porque estas técnicas são menos influenciadas pelos eventos de decomposição, de fragmentação, de carbonização parcial e em alguns casos de inexistência de dados *antemortem*, em especial



quando existem supostos parentes da vítima, sendo considerada como a última grande linha de identificação, por exemplo, nos casos de desastre de massa (JARRETA, 1998). Lembra-se também que os antigos marcadores genéticos utilizam-se de proteínas, às quais correspondem ao genoma codante, isto é, menos de 5% do genoma total, o que implica que o uso potencial do DNA pode facilmente extrapolar este índice.

3. Como é feita a obtenção do DNA? Que métodos são mais confiáveis? Para cada material utiliza-se um determinado método?

A obtenção do DNA nada mais é do que um processo físico-químico de purificação do DNA a partir de uma amostra biológica, que necessariamente deve conter células nucleadas (FIG. 14). De um modo geral, este processo inicia-se com a centrifugação, a fim de se sedimentar e separar as fases que interessam ao experimento. Através de reagentes químicos, iniciam-se os processos de lise ou ruptura da membrana plasmática das células, posteriormente da membrana nuclear, até se chegar à purificação do DNA, separando-o das proteínas dos cromossomos.

Existem vários métodos convencionais desenvolvidos para a extração e uma infinidade de métodos adaptados a partir deles. Contudo, de uma

forma geral, pode-se trabalhar a partir de dois tipos de métodos: os métodos orgânicos (SAMBROOK *et al.*, 1989), que são mais tradicionais, e os métodos baseados em *kits* comerciais desenvolvidos por indústrias de fármaco-químicos. Logicamente que alguns métodos apresentam-se mais vantajosos que outros, todavia o maior sucesso no emprego de uma determinada técnica de extração está na dependência do sucesso do laboratório em adaptar-se a determinados protocolos, de seguir uma rigorosa normatização e controle de qualidade, além é claro do tipo de material biológico a ser tipado. Por exemplo, a extração do DNA de um dente carbonizado além de ser bem mais penosa por necessitar de mais etapas de preparação e purificação, é realizada de forma diferente que o sangue. Por isso, o conjunto de protocolos, de metodologias, enfim de rotinas, está diretamente relacionado à capacidade adaptativa do laboratório a determinadas metodologias, modificadas ou não. As técnicas convencionais têm a tendência de apresentar um menor custo comercial e de poderem ser mais facilmente adaptadas às circunstâncias das amostras, apesar de serem mais trabalhosas. Já os *kits* comerciais apresentam metodologia mais simplificada e menor tempo para se realizar a extração, mas é preciso atentar-se às indicações e recomendações do kit. Muitos trabalhos afirmam que as técnicas convencionais, como o método da sílica e o do fenol-clorofórmio,

apresentam resultados mais satisfatórios no quesito pureza do DNA obtido, o que se pode traduzir em resultados mais fidedignos (HOFF-OLSEN, 1999; ALVES, 2000). Alguns compostos químicos utilizados para se precipitar ou solubilizar o DNA nas etapas de purificação podem comprometer a qualidade do DNA, podendo interferir nas etapas subseqüentes como a eletroforese, a amplificação e a hibridização. O índice de sucesso de uma extração é diretamente proporcional aos quesitos quantidade e qualidade (pureza) do DNA obtido, quanto maior a quantidade de DNA íntegro e de alto peso molecular, melhores serão os resultados.



FIGURA 14 – Purificando o DNA

4. Como se interpreta as siglas de alguns marcadores genéticos usados em PCR e RFLP?

A nomenclatura estabelecida para definir um *locus*, o qual pode abrigar um gene ou simplesmente uma seqüência de DNA alvo, utiliza quatro elementos: (1) a letra **D** que significa DNA; (2) a designação do cromossomo em que o *locus* está presente (1,2,3...22,X,Y); (3) a descrição da complexidade da seqüência de DNA, na qual o **S** significa seqüência simples, **Z** seqüência altamente repetida e **F** representa uma família de genes ou segmentos de DNA com grande semelhança entre si; (4) um número referente à ordem na qual as seqüências são descritas de tal forma que, em conjunto com os outros elementos, tornam este *locus* único (FARAH, 1997). Por exemplo, **D1S80** designa um *locus* no cromossomo 1, o qual contém seqüência simples e foi a 80ª a ser descrita neste cromossomo. Entretanto alguns marcadores não se enquadram necessariamente na nomenclatura dita clássica, sendo eventualmente classificados em relação a um gene em cujas imediações se localiza, ou a partir da abreviação do nome de uma anomalia ou de um cientista pioneiro, ou seguem classificação do *genbank*, além de outras fontes diversas. Na TAB. 01 pode-se ver alguns marcadores clássicos em genética forense.



TABELA 01

Localização cromossômica de alguns marcadores para tipagem de DNA

Cromossomo	Marcador STR baseado em PCR	Marcador VNTR baseado em RFLP	Outros marcadores baseado em PCR
1	F13B, RENA4, D1S1171	D1S7, D1S339	D1S80
2	TPOX, APOB, D2S410, D2S436, D2S1242, D2S1338	D2S44	apoB
3	D3S1349, D3S1352, D3S1358, D3S1359, D3S1744, ACP		
4	FGA (FIBRA), FABP, GABARB15	D4S139	GC (PM), GYPA (PM)
5	CSF1PO, D5S373, D5S815, D5S818	D5S110	
6	F13A1, ACTBP2 (SE33), FOLP23, D6S366, D6S502, D6S965	D6S132	DQ α
7	D7S460, D7S809, D7S820, D7S1517, D7S1520	D7S21, D7S22, D7S467	D7S8 (PM)
8	LIPOL (LPL), D8S306, D8S320, D8S323, D8S344, D8S347, D8S639, D8S1179		
9	D9S52		
10	D10S89	D10S28	
11	TH01 (TC11), APOA1, D11S554, UGB		HBGG (PM)
12	VWA, CD4, PLA2A1, D12S67, D12S391, D12S1090	D12S11	
13	D13S308, D13S317		
14	D14S306	D14S13	
15	FES/FPS, CYAR04 (P450), Penta E		
16	D16S539, D16S537	D16S85	
17	D17S976	D17S79, D17S26	D17S5, YNZ22
18	MBP, D18S51, D18S535, D18S849		
19	D19S253, D19S433		LDLR (PM)
20	D20S85, D20S470		
21	D21S11, Penta D		
22			
X	HPRTB, ARA, STRX1, DXYS156		Amelogenina
Y	DYS19, DYS385, DYS389a, DYS389b, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DXYS156		Amelogenina
mtDNA			HV1, HV2

Fonte: Adaptada do National Institute of Standards and Technology (SHORT...2001)

5. Como interpretar a nomenclatura das enzimas de restrição?

A propriedade que caracteriza uma enzima de restrição é sua capacidade de reconhecer uma dada seqüência. As enzimas de restrição comumente utilizadas em engenharia genética são as do tipo II, no qual as enzimas reconhecem uma dada seqüência e a clivam em local específico, isto é, um sítio específico. Estes sítios correspondem a seqüências de 4 a 8pb, apresentando uma característica de simetria rotacional, isto é, são palindrômicas, onde as suas extremidades são complementares.

Com a descoberta constante de novas enzimas de restrição, houve necessidade de padronização das mais de 500 enzimas atualmente conhecidas. Exemplos, segundo SMITH & NATHAUS, 1974 *apud* LEWIN, 2000:

Hae III – 3ª Endonuclease de *Haemophilus Aerobius*

EcoRI - Endonuclease de *Escherichia coli* RY13

- A primeira letra maiúscula representa o gênero do organismo. As duas letras seguintes minúsculas representam as duas primeiras letras da espécie, formando uma abreviação de três letras em itálico

- Às vezes há a necessidade de se identificar a cepa ou tipo de organismo hospedeiro, isto é feito adicionando-se uma letra minúscula à seqüência de três letras.
- Quando um hospedeiro apresenta várias enzimas de restrição, elas são identificadas por algarismos romanos. EcoRI – 1ª enzima encontrada em *Escherichia coli*.

Em genética populacional e em genética forense, a padronização das técnicas de RFLP, bem como de seus banco de dados, é baseada no comprimento dos fragmentos de restrição obtidos pela enzima *HaeIII*, inclusive o banco de dados utilizado pelo FBI e pela grande maioria dos institutos de pesquisa do mundo. A enzima *HaeIII* apresenta algumas vantagens como a maior tolerância às condições da reação, não estando sujeitas a pequenas variações de temperatura, pH e concentração iônica. Outras enzimas como a *PstI* produzem fragmentos genômicos de alto peso molecular, tornando a discriminação e a leitura mais difíceis de serem realizadas, enquanto que enzimas como *Hinf* produzem perfis distintos de fragmentos entre materiais biológicos de um mesmo indivíduo (MOURA NETO, 1998). Todavia existem grupos e instituições comerciais que se utilizam da enzima *PstI* como a Lifecodes® e a Promega Corporation® (DEVLIN & RISCH, 1991).

6. O que são "primers" e quais as propriedades que estes iniciadores devem ter?

Primer é um oligonucleotídeo ou pequeno segmento de DNA ou RNA que, anelado à fita simples de DNA, permite que a enzima polimerase do DNA sintetize a segunda fita de DNA, formando a dupla hélice. Embora os oligonucleotídeos, que atuam como *primers*, possam ser muito pequenos, eles devem ser suficientemente grandes para identificar uma única seqüência complementar no genoma humano, garantindo a amplificação específica do fragmento que se deseja (FARAH, 1997). A escolha dos *primers* é um dos pontos críticos para a eficiência do método de PCR, o que atualmente tem sido largamente beneficiado pelo auxílio da informática, em especial dos programas específicos que fornecem a seqüência das bases no fragmento que se deseja amplificar, indicando as regiões mais favoráveis para o acoplamento dos *primers*, inclusive fornecendo as condições ideais de temperatura, salinidade e tempo para a PCR em função da composição das bases no fragmento que se deseja amplificar.

Algumas características gerais dos *primers*, segundo ¹GIBCO BRL® :

- Para cada *locus*, devem sempre ser em número de dois, um para cada fita e em sentidos opostos.
- Ser específico às regiões de amplificação do molde ou *template* e não apresentar similaridade com outras regiões do genoma



- Os *primers* devem ter cerca de 18 a 30pb, mas usualmente 20 a 21pb
- Possuir conteúdo de Citosina+Guanina (G+C) levemente acima de 50%.
- Não apresentar regiões de tendência de complementariedade em sua estrutura dimensional, a fim de não formam estruturas em forma de grampos ou dímeros na região 3'.
- Possuir temperatura média de ciclo acima de 55°C.

7. O que são as sondas de VNTR e como elas funcionam?

A hibridização é um método que utiliza a tendência natural que uma cadeia simples de DNA tem de se reassociar com sua cadeia complementar para formar a dupla hélice. Dessa forma, um determinado fragmento de DNA pode ser localizado em uma mistura heterogênea, desde que disponha de uma seqüência complementar ao fragmento alvo, chamada sonda. Sondas nada mais são do que fitas simples de DNA ou RNA que tenham sido marcadas, quimicamente ou radioativamente, e podem ser usadas para identificar genes ou fragmentos de DNA de interesse, por meio da complementariedade de sua seqüência de bases com uma região alvo. A marcação prévia do DNA da sonda propiciará a emissão de radiação ou luminosidade em uma película de raios-X, viabilizando assim a análise dos fragmentos alvos que foram submetidos a eletroforese.

Principais propriedades de uma sonda:

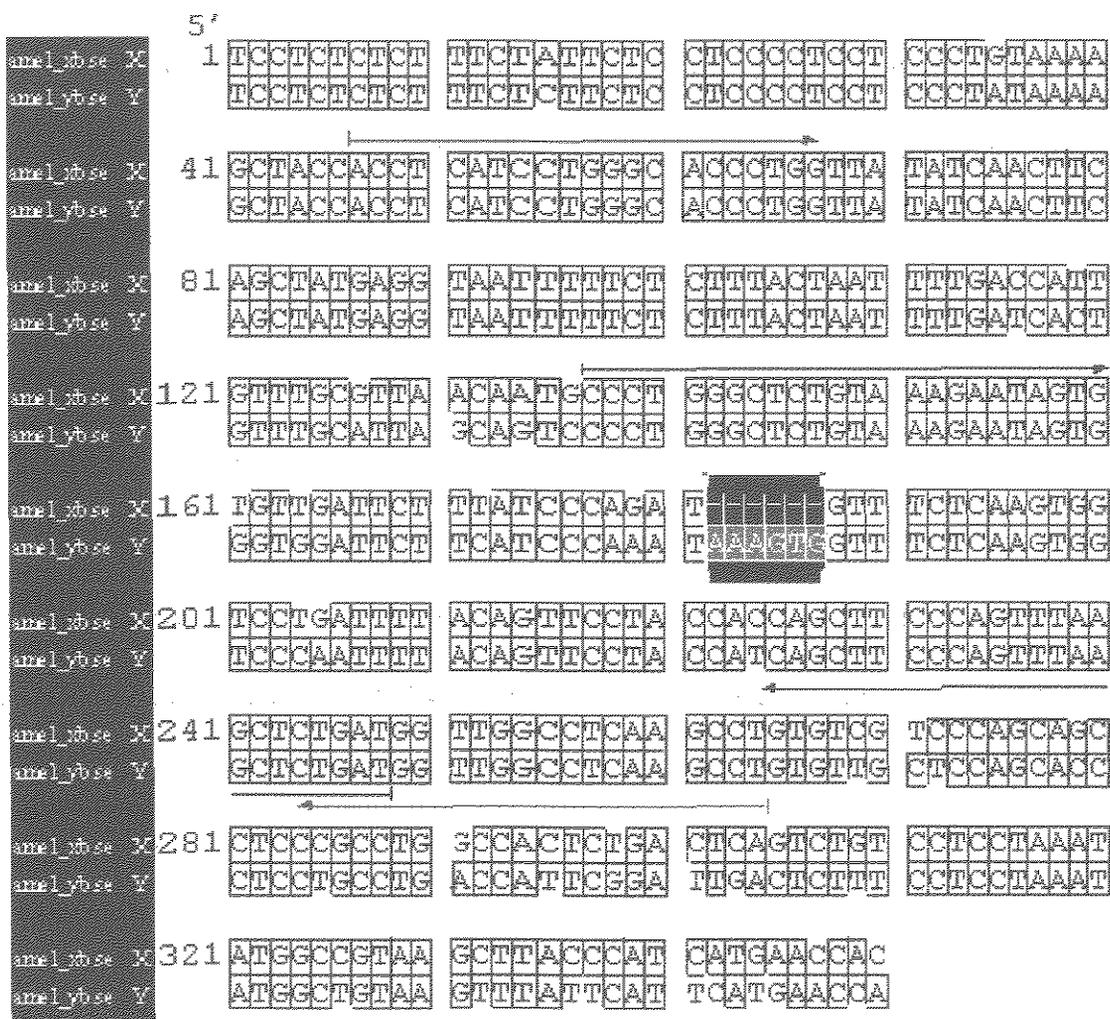
- Deve reconhecer um *locus* ou sítio humano único, cuja localização cromossômica tenha sido determinada;
- Deve detectar um número constante de bandas por alelo nos seres humanos;
- Deve estar caracterizado pela literatura publicada, incluindo sua variação típica de alelos e sua tendência de reconhecer o DNA de outras espécies;
- Deve ficar à disposição para estudo científico por qualquer pessoa interessada.

8. Como é feito o diagnóstico de sexo e espécie?

Diversos são os métodos científicos de se realizar o diagnóstico de sexo, desde um cadáver ou esqueleto encontrado até uma amostra de local de crime. Contudo, na área molecular, apesar do desenvolvimento das técnicas de reações imuno-específicas e microscópicas, por cortes histológicos ou esfregaço de células, estas não se apresentavam aplicáveis o suficiente, carecendo de um coadjuvante mais informativo. As provas em DNA possibilitaram a análise do sexo biológico de um indivíduo, mesmo a partir de pequenas amostras. Alguns marcadores possibilitam o êxito da investigação de sexo, analisando-se especificamente os cromossomos sexuais, principalmente pela PCR. Diversas são as maneiras de se determinar o sexo em humanos (TAB.



02), analisando-se marcadores genéticos como a amelogenina (gene relacionado com a formação do esmalte dentário), o DXYS156, ZFX/ZFY, SRY 93, além dos marcadores do cromossomo Y. A presença de resultados nos marcadores do cromossomo Y poderia simplesmente excluir a amostra como sendo de um indivíduo do sexo feminino, contudo a necessidade de controlos positivos e negativos para esta prova se fazem necessários, principalmente em casos de contaminação de amostra ou de mistura. Por isso, além de ser o mais conhecido, o *locus* amelogenina é o mais indicado para este fim principalmente por poder ser co-amplificado com os sistemas *multiplex* para STR. O *locus* é amplificado em ambos os cromossomos (X e Y), mas com fragmentos de tamanhos diferentes (FIG. 15), possibilitando a identificação do sexo.



● Promega Primers (X= 212 bp, Y = 218 bp)

● British Primers (X= 106 bp, Y = 112 bp)

FIGURA 15 – Locais de amplificação do *locus* amelogenina nos cromossomos X e Y, formando fragmentos 6pb maiores no cromossomo Y em relação ao seu homólogo X, devido à presença da seqüência AAAGTG (em negrito). Notar que existem variações no tamanho dos fragmentos conforme o conjunto de *primers* empregado, ou seja, a variação depende do local de flanqueamento dos *primers*.

Fonte: Adaptada do *National Institute of Standards and Technology* (SHORT...2001)



TABELA 02

Alguns dos marcadores para tipagem de sexo e generalidades

Locus	Primers	Tamanho do Produto	Comentários
Amelogenina (Padrão Britânico)	5'-CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG-3'	X = 106pb	Pode-se usar em sistema <i>multiplex</i> STR
	5'-ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG-3'	Y = 112pb	
Amelogenina (Promega Corporation®)	5'-ACCTCATCCTGGGCACCCTGG-3'	X = 212pb	Pode-se usar em sistema <i>multiplex</i> STR ou D1S80
	5'-AGGCTTGAGGCCAACCATCAG-3'	Y = 218pb	
Amelogenina (ENG et al.)	5'-CTGATGGTTGGCCTCAAGCCTGTG-3'	X = 977pb	Pode ser analisada por gel de agarose
	5'-TAAAGAGATTCATTAAGTGGTGG-3'	Y = 788pb	
Repetição centromérica alfoíde (1)	5'-TATTTGGACTCTCTCTGAGGA-3' (x3)	X = 157pb Y = 200pb	As seqüências X e Y podem ser co-amplificadas
	5'-TTCTACTACAAGGGTGTGCA-3' (x4)		
	5'-GTGTATTCACCTCCGGGAG-3' (Y3)		
	5'-ACAAAAGGTTCAATTCTGTGAG-3' (Y4)		
Repetição centromérica alfoíde (2)	5'-AATCATCAAATGGAGATTTG-3' (X1)	X = 170pb Y = 130pb	Pode-se realizar reações separadas de PCR, uma para o X e outra para o Y
	5'-GTTTCAGCTCTGTGAGTGAAA-3' (X2)		
	5'-ATGATAGAAACGGAAATATG-3' (Y11)		
	5'-AGTAGAATGCAAAGGGCTC-3' (Y22)		
ZFX/ZFY (zinc finger gene)	5'-CTGGAGAGCCACAAGCTGAC-3'	X/Y = 209pb após corte com HaeIII X = 172 +37 Y = 88 +84 +37	Tipagem por <i>dot blot</i> reverso; pode ser usado com AmpliType PM and HLA-DQA1
	5'-TTGCTGTGGACTGCCAAGAG-3'		
SRY 93	5'-ATAAGTATCGACCTCGTCGGAAG-3' 5'-GCACTTCGCTGCAGAGTACCGAAG-3'	Y = 93pb	Pode ser utilizada com a amelogenina

Fonte: Adaptada do National Institute of Standards and Technology (SHORT...2001)

A possibilidade de discriminação de se distinguir as outras espécies do homem pode ser realizada sem maiores problemas. Em um clássico trabalho, CROUSE & SCHUMM (1995) examinaram a especificidade de espécies de nove sistemas de STR, relatando que não houve nenhum produto amplificado em 17 das 23 espécies estudadas. O DNA de primatas, como o gorila, chimpanzé e orangotango, foram amplificados satisfatoriamente, mas a grande maioria dos produtos amplificados migrou para fora do padrão de escala alélica humano, não podendo sequer ser tipado e classificado pelo peso molecular.

9. *Quais as vantagens das técnicas de STR/PCR e VNTR/RFLP?*

Se por um lado, os sistemas STR/PCR são menos informativos, por apresentarem *locus* com um menor polimorfismo, uma menor variabilidade, um grau de heterozigose menor que os sistemas VNTR/RFLP, por outro lado estes problemas simplesmente poderiam ser resolvidos analisando-se um maior número de regiões no genoma, além disso, dada a menor variabilidade genética, os STRs tendem a apresentarem menores taxas de mutações. É preciso ressaltar, contudo, que os sistemas em VNTR/RFLP são extremamente úteis e perfeitamente válidos, e que se bem empregados apresentarão resultados extremamente satisfatórios.



Todavia existe uma maior tendência nacional e internacional em se utilizar os sistemas STR/PCR como padrão de referência laboratorial. Segundo declaração do Dr. Dario Grattapaglia, diretor clínico do laboratório Heréditas, as vantagens relativas aos sistemas de STR/PCR apresentam-se atualmente bem mais evidentes em comparação aos sistemas convencionais VNTR/RFLP:

“Utilizamos somente locos microssatélites uma vez que eles permitem a declaração precisa e absolutamente reproduzível dos genótipos em qualquer laboratório. Pois se utiliza de escadas alélicas de consenso internacional. No caso das sondas uni ou multilocais os alelos são estimados e então declarados em pares de bases. A estas estimativas estão associados grandes desvios-padrão, além do problema de perda de alelos pequenos. Em suma, o uso de sondas é uma tecnologia que está rapidamente caindo em desuso, basta ver que nos últimos exercícios da ISFG dos quais participamos, somente cerca de 6 laboratórios em 57 ainda utilizam sondas, e ainda em complementação aos *loci* STR. Não existe qualquer motivo técnico para se usar sondas hoje, uma vez que existem dezenas de locos STR altamente informativos e internacionalmente validados para investigação forense (GRATTAPAGLIA *et al.*, 2000).

RASKIN (1995) destaca também outras vantagens dos sistemas STR/PCR como:

- Menor taxa de mutação dos marcadores;
- Facilidade de discriminar alelos diferentes;
- Facilidade de fazer banco de dados de população;
- Fácil padronização inter e intra-laboratório;
- Possível visualizar resultados em gel não desnaturante de acrilamida ou até agarose;
- Não utiliza material radioativo;
- Exame pode ser feito independentemente de haver pouco ou muito DNA, degradado ou intacto, permitindo a análise inclusive em casos de exumação;
- É possível evitar a coleta de sangue, usando *swab* bucal;
- Determinação de sexo genético nas amostras é possível;
- Permite a construção de escadas alélicas;
- Não necessita definir *bins* arbitrários;
- Fácil interpretação pelas partes e área jurídica;
- Tamanhos pequenos e definidos dos fragmentos permitem múltiplas amplificações simultâneas (multiplex);
- Possibilidade de automação;
- Tempo de resultado menor;
- Controle de qualidade mais preciso;

- 
- Tecnicamente mais simples com custos e, portanto, preços mais em conta.

Apesar disso, inúmeros são os especialistas que além de recomendar a utilização, se possível de ambas as técnicas, fazem o uso preferencial pelas sondas dos sistemas de VNTR/RFLP como técnica de eleição, citando através disso as suas principais características funcionais:

- Os sistemas VNTR/RFLP já foram largamente testados e aprovados pela comunidade científica internacional, sendo os métodos pioneiramente utilizados nessa área;
- A baixa heterozigose, o pequeno número de alelos e a heterogeneidade da distribuição alélica tornam o polimorfismo dos STRs consideravelmente vulneráveis aos efeitos de endogamia e sub-estruturação populacional (PENA, 1995), além dos casos onde o indagado (suspeito ou suposto pai) é um parente próximo do verdadeiro responsável;
- Um sistema de 6 sondas tradicionais de VNTR (minissatélites) traduz-se, em sua grande maioria, a uma probabilidade de paternidade de no mínimo 99,999%, em contrapartida com os sistemas STR/PCR que produzem em média 99,99%, ou seja, com o dobro de marcadores produz-se menor poder de inclusão de identidade ou paternidade (THOMSON, 1998);
- Durante ensaios de comparações de dados realizados pelo *Federal Bureau of Investigation* (FBI) em 1992, não foram encontrados pares que combinassem com os perfis de DNA em 5 *loci* VNTR, e a combinação mais próxima foi uma única de 3 *loci* entre 7,6 milhões de comparações pareadas (COMMITTEE, 1992).

As recentes opções ao sistema STR/PCR por órgãos de reconhecida reputação internacional, como o NIST norte-americano, denotam a maior potencialidade de padronização e comparação inter-laboratorial desse sistema em relação às tradicionais sondas unilocais e multilocais, junta-se a isso a indiscutível aplicabilidade das técnicas de PCR em casos de amostras reduzidas, prejudicadas e contaminadas, principalmente as amostras de crime. Contudo, apesar de todas essas tendências, é conveniente que a credibilidade dos exames de VNTR seja mantida e resguardada, cita-se como exemplo, o fato do FBI ainda manter um relevante banco de dados baseado na tecnologia de sondas, recomendando ainda a utilização mínima de 4 marcadores RFLP para seus arquivos, apesar de já ter implantado efetivamente um sistema totalmente baseado em STR/PCR de 13 *loci*, o CODIS.

10. Como são feitas as classificações dos alelos em RFLP e em PCR?

Em RFLP, no caso das sondas uni ou multilocais os alelos são declarados em pares de bases, a determinação do *bin* de um alelo, baseia-se na caracterização de um fragmento dentro de um determinado intervalo conforme o seu tamanho em pares de bases. Constitui-se em um método um tanto subjetivo e empírico, podendo variar de anotador para anotador, dada às possibilidades de desvio-padrão. Desta forma, uma

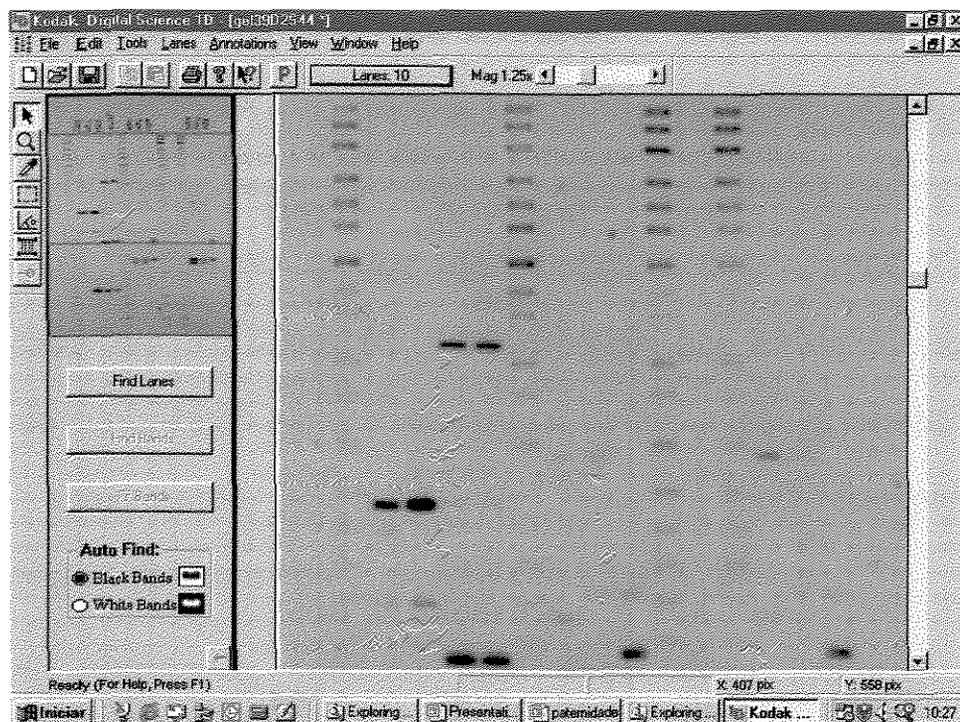


FIGURA 16 - As auto-radiografias são digitalizadas por uma câmera conectada ao computador.

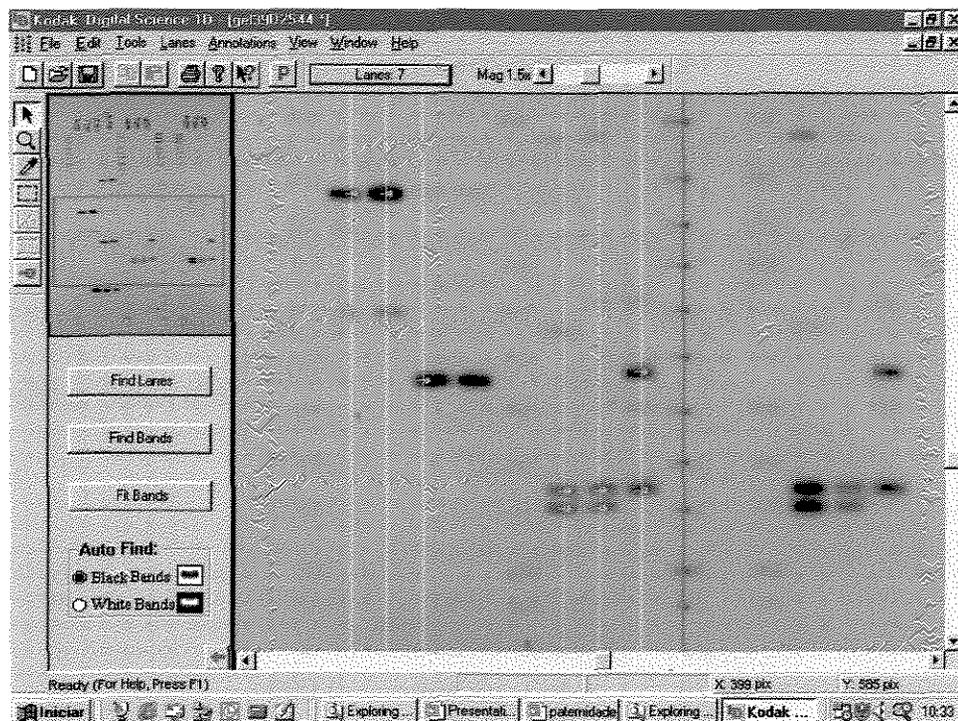


FIGURA 17 - Utilização de um software específico para a localização das bandas de interesse
Fonte: Laboratório Exact Gene – Campinas(SP)

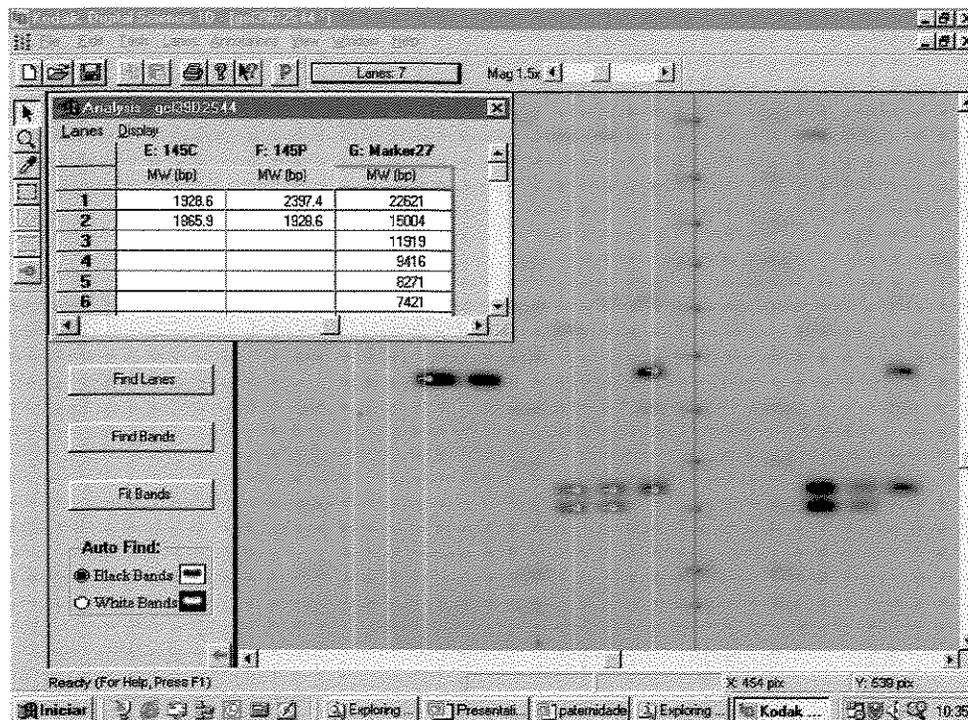


FIGURA 18 - O tamanho de cada banda, em pares de bases, é determinado automaticamente

Fonte: Laboratório Exact Gene – Campinas(SP)

A técnica de STR via PCR permite a declaração precisa e absolutamente reproduzível dos genótipos. Pois se utiliza de escadas alélicas de consenso internacional. Além disso, os alelos da PCR são classificados pelo número de repetições do núcleo repetitivo de um determinado *locus*. Por exemplo, um dos alelos de um sistema tem 20 repetições, ele é denominado alelo 20 (FIG. 19).

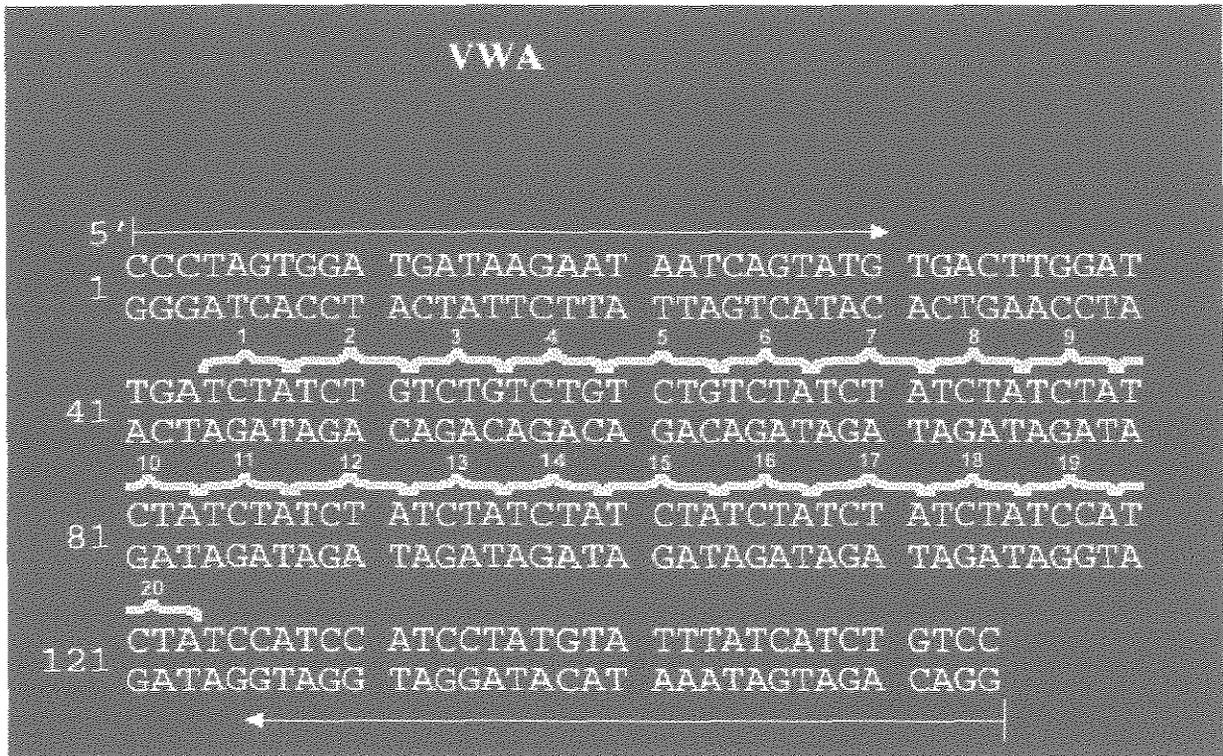


FIGURA 19- Locus vWA com o alelo 20, isto é, com 20 unidades repetitivas

No primeiro ensaio de controle de qualidade realizado pela Sociedade Brasileira de Medicina Legal, em 1998 (SIMÕES, 2000), foram realizados testes de proficiência tanto pela PCR como por RFLP, contudo a padronização ficou muito mais evidente nas técnicas baseadas em PCR, havendo algumas discrepâncias de classificação em RFLP, dificultadas em função da subjetividade de anotação individual e de desvios-padrões na calibragem de algumas etapas de trabalho e de materiais empregados entre os laboratórios, tais como: a eletroforese, a concentração do gel, a intensidade da corrente elétrica utilizada, entre outros, contudo sem influenciar nos resultados objetivos do ensaio.

11. Quantas sondas e quantos "loci" são necessários para fornecerem índices seguros de confiança?

¹PENA (2001), recomenda a utilização de no mínimo 06 sondas unilocais ou 02 sondas multilocais para os casos de investigação de paternidade, tendo em vista o maior carácter informativo das sondas em relação aos STR/PCR. Dependendo do tipo de sonda escolhida, ela extrapola facilmente o índice de heterozigose de 90%, tornando-se extremamente informativa em análises de paternidade, sendo unanimemente indicado menos da metade do número de marcadores VNTR unilocais em relação aos STR/PCR. Todavia, deve-se ter critérios ao escolher as sondas a serem empregadas, por exemplo, *loci* com baixa variabilidade, isto é, menor que 90% de heterozigose, tendem a apresentar distribuições de freqüências alélicas irregulares, além de estarem mais susceptíveis à deriva genética e à endogamia.

CHAKRABORTY, *apud* ⁵PENA (2000) recomenda que o número de *loci* necessários para determinar-se com segurança relações pai-filho seja de aproximadamente 6 sondas unilocais com mais de 90% de heterozigose para VNTR (⁶PENA, 2001), e sobe para ao redor de 15 para as análises de microssatélites que em geral apresentam grau de heterozigose entre 70 e 80%, em detrimento de alguns anos atrás onde se indicava menos

⁵ Idem nota 4

⁶ PENA, S.D.J. (Núcleo de Genética Médica - GENE) **Comunicação Pessoal**. 2001



de 12 *loci* para esses exames. Isto ocorre na prática, porque as populações apresentam considerável grau de subestruturação e o poder de exclusão efetivo é consideravelmente inferior ao calculado teoricamente, inclusive na população brasileira. Na prática a maioria dos STRs apresentam poder de exclusão de paternidade na ordem de 50 a 75%, enquanto para as sondas unilocais este índice é maior, em torno de 80 a 95%.

Com base em simulações numéricas, GRATTAPAGLIA *et al.* (2000) verificou, conforme previsto, que o risco potencial de falso-positivos diminui à medida que mais *loci* STR são analisados, entretanto com 12 *loci* estudados, o risco de falso-positivos ainda poderia ser de até 40 em 100.000 exames de exclusão. Recomendando-se 16 *loci*, os autores verificaram não haver maiores problemas quanto ao ganho de poder de exclusão ou da obtenção de falsas inclusões. O trabalho revelou ainda que uma análise de 447 casos de exclusões resolvidos com 17 *loci* STR, teria uma chance matemática de produzir 8 casos de falsas inclusões, com mais de 99,9% de chance de probabilidade, se tivessem sido utilizados apenas 12 *loci* STR.

É preocupante a observação de que alguns laboratórios de determinação de paternidade estão oferecendo perícias a partir de resultados baseados em apenas 6 a 9 testes de PCR de microssatélites ou 2 a 3

sondas unilocais de minissatélites, incorrendo ao risco de chegarem a conclusões equivocadas, em especial de uma falsa inclusão de identidade ou paternidade (PENA, 2001). Existem atualmente diversas interpretações jurídicas para a interpretação dos "9" antes e depois da vírgula em probabilidade de paternidade ou identidade. Nos Estados Unidos as probabilidades de paternidade relativa (W) são classificadas a partir da cifra de 90%, onde um índice entre 90 e 94% é caracterizado como paternidade provável, 95 e 99% como paternidade muito provável, 99 e 99,73% como paternidade extremamente provável e acima de 99,73% como paternidade praticamente provada. Hodiernamente para uma conclusão mais objetiva de inclusão de paternidade ou identidade, o índice mínimo aceitável deverá ser de 10000 para o índice de paternidade (IP) ou identidade, e de 99,99% para a probabilidade de paternidade (W) ou identidade. Contudo não se deve esquecer que as investigações de paternidade e de identidade são processos que requerem uma conclusão impreterivelmente absoluta, única e direta, dada a natureza de seu objetivo: "ou é ou não é o alegado". Dessa forma é imprudente, arriscado e inseqüente o profissional que afirmar veementemente e com 100% de chances uma probabilidade de paternidade que apesar dos inúmeros "9" após a vírgula, não é o absoluto 100%.



12. Como funcionam os sistemas multiplex para PCR?

Os fragmentos de STR variam em torno de 100 a 500pb, sendo que a variação de um alelo para outro de um mesmo *locus* geralmente é devido à diferença do número de seqüências repetidas do núcleo repetitivo, este geralmente tetramérico. Portanto em um sistema tetramérico, por exemplo, a diferença entre um alelo e o seu alelo imediatamente maior ou menor, se dará de 4 em 4 pares de bases, ou seja, correspondente ao núcleo repetitivo. Dessa forma um dado STR dará origem a alelos que não apresentarão grandes variações de comprimento entre si, mesmo do maior alelo para o menor alelo, diferentemente dos sistemas VNTR onde os alelos podem variar de menos de 600pb até 25000pb, como no caso dos alelos do *locus* D1S7. Conseqüentemente STRs que apresentam variação de peso molecular bem distintos podem ser amplificados juntos e analisados distintamente. Com o surgimento dos marcadores fluorescentes e da tecnologia de automação para PCR, tornou-se possível não somente utilizar conjuntos de STR com padrões distintos, mas inclusive de STR que anteriormente apresentavam *overlapping* (sobreposição) de peso molecular com outros. A tecnologia baseia-se que os diferentes tipos de marcadores fluorescentes, podendo ser no máximo 3 por reação, podem ser co-

amplificados em uma mesma reação de PCR, pois emitem faixas de marcação que são reconhecidas distintamente pelo seqüenciador. Contudo não se deve utilizar em um mesmo marcador fluorescente, STRs que apresentem sobreposição após amplificação.

Existem no mercado *multiplex* com até 16 STRs (FIG.20), que podem ser co-amplificados em uma mesmíssima reação, isto resultou numa relevante economia de tempo e custo operacional à tecnologia de STR/PCR, dada a versatilidade do método.

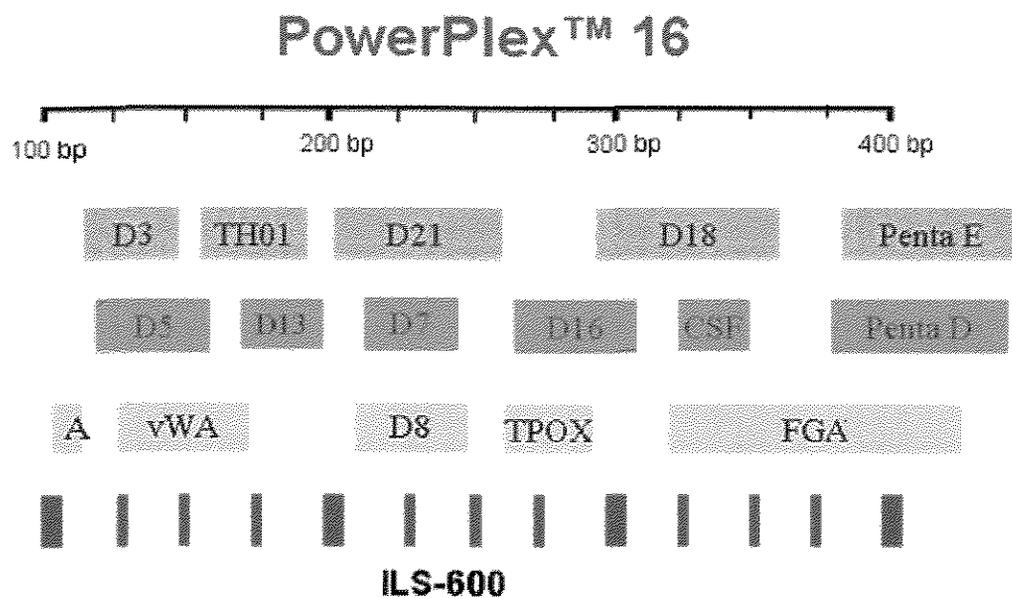


FIGURA 20 – *Primer multiplex* para 16 STR

13. Quantas exclusões são necessárias nos diversos sistemas para se concluir um caso?

Sob o ponto de vista racional, desde a utilização da genética clássica, as exclusões de identidade são categóricas e as inclusões probabilísticas.



Entretanto, é um fato pouco compreendido que a situação operacional de um laboratório é inversa. Erros técnicos nos procedimentos de testes de paternidade podem criar falsas exclusões. Assim, todos os laboratórios devem obrigatoriamente ter mecanismos para reconfirmar rotineiramente todas as exclusões, para garantir que elas representam "verdadeiras exclusões" (⁷PENA, 2001). Por exemplo, em análises de VNTR/RFLP o *locus* mais polimórfico é o D1S7 (MS1), com mais de 99% de heterozigose e uma infinidade de alelos possíveis. Entretanto, a sua heterogeneidade informativa está diretamente relacionada a um importante motivo, sua elevada taxa de mutação (maior que 5%), e isso o torna inadequado em testes de paternidade ou qualquer outra análise de vínculo genético.

É de consenso da comunidade científica internacional que no mínimo dois *loci* STR ou VNTR são necessários para se concluir uma exclusão de paternidade (JARRETA, 1998; JOBIM *et al.*, 1999), principalmente porque a probabilidade de ocorrer mutação em uma trinca verdadeira para apenas 1 *locus* é sensivelmente maior do que um indivíduo escolhido ao acaso ser excluído em apenas um único *locus*, em detrimento aos demais *loci* do sistema onde houve inclusão. Ou seja, é mais fácil o investigado ser o pai biológico da criança, com a presença

⁷ Idem nota 4

de 1 mutação em um dado *locus*, do que ele não ser o pai biológico e apresentar um conjunto de inclusões com um único *locus* de exclusão. Estima-se que, para o sistema STR/PCR, a probabilidade de mutação em 1 *locus* seja cerca de 30 vezes maior do que uma verdadeira não-paternidade com apenas 1 *locus* de exclusão. Em contrapartida, quando há a presença de 2 *loci* de exclusão em um dueto suposto pai e filho, estas probabilidades se invertem radicalmente, onde a probabilidade de não paternidade é cerca de 46 vezes maior do que a ocorrência de 2 mutações em 2 *loci* diferentes. Em 3 *loci* esta proporção sobe para mais de 77625 (THOMSON, 1999). Atualmente existem correntes mais rigorosas que pregam a exclusão de no mínimo 3 *loci* STR a fim de se dirimir quaisquer dúvidas ou possibilidades contrárias (GRATTAPAGLIA *et al.*, 2000).

14. Listar alguns dos elementos cruciais que podem ser empregados para avaliar a confiabilidade de um serviço de determinação de paternidade.

Adaptamos alguns dos principais itens, conforme RASKIN (1998); JOBIM (1999); GRATTAPAGLIA (2000) e PENA (2001).

- O laboratório deve estar sob direção de um profissional competente, de preferência com título de mestre ou doutor em área



afim e com competência prática e teórica em determinação de paternidade e identificação humana há pelo menos 5 anos;

- O laboratório deve realizar as perícias com 02 sondas multilocais, ou então 6 sondas unilocais ou pelo menos 15 STR/PCR. Deve dominar também tecnicamente pelo menos duas das três metodologias existentes para testes de determinação de paternidade e identificação por DNA;
- O laboratório deve ter uma rotina de trabalho de auto-vigilância dos seus procedimentos, ou seja de controle de qualidade intralaboratorial, evitando-se que erros passem despercebidos, tais como a desastrosa troca de rótulos das amostras. Deve também trabalhar com contra-prova ou *backup* devidamente documentado;
- Usar controle positivo como o K562, a fim de se detectar possíveis discrepâncias técnicas dos materiais utilizados na técnica;
- Utilizar controle negativo, principalmente nas técnicas de PCR, a fim de se detectar a presença de possíveis contaminantes (*amplicons*);
- O laboratório deve ter disponível um banco de dados das frequências populacionais dos diversos sistemas genéticos usados por ele. Este banco de dados deve ser obtido com as mesmas técnicas usadas pelo laboratório nos seus exames de rotina e

utilizando uma mesma população, além do mais, o banco de dados deve estar disponível para consulta e preferencialmente ter sido publicado. Deve-se evitar a utilização de banco de dados estrangeiros em uma amostra de população nacional, dada às variações genéticas cientificamente comprovadas entre populações diferentes.

- Nos casos de exclusão de paternidade duvidosa, o laboratório deve garantir que essa exclusão seja comprovada com pelo menos dois tipos de exames genéticos diferentes.
- Nos casos em que não há exclusão de paternidade, o laudo pericial deve incluir o Índice de Paternidade (IP) para cada sistema genético utilizado, o Índice de Paternidade Combinado (IPC) e a Probabilidade de Paternidade (W), relatando também as probabilidades *a priori* utilizadas.
- Deve haver uma separação física entre o recinto em que se realiza o preparo das amostras ou a extração dos materiais biológicos, e a sala de amplificação das amostras nas técnicas baseadas em PCR.
- Realizar periodicamente testes de proficiência interno e externo.



15. Correlacionar algumas fontes de erros com as conseqüências técnicas?

Extrair DNA com compostos químicos não indicados ou altamente reativos: Ausência ou alteração no padrão de amplificação normal, ou deficiência na hibridização das sondas ou digestão pelas enzimas de restrição, formando bandas anômalas;

Contaminar com amplicons o recinto de preparação das amostras: Pode resultar em um falso negativo ou em um padrão de multibandas (mais de duas por *locus*);

Trocar amostras: tendência de resultados falso-negativos e de coincidências invertidas de resultados;

Contaminar amostras: formação de bandas anômalas;

Misturar amostras: presença de um padrão de multibandas (mais de duas por *locus*);

Utilizar DNA degradado ou alterado: Alteração de sítios da endonuclease de restrição com tendência à subdigestão nos casos de RFLP, formando fragmentos de pesos anômalos, ou incorre na ausência de amplificação pela PCR conforme o grau de degradação;

Utilização de um número insuficiente de sondas VNTR ou loci STR:

Resulta num poder de discriminação insuficiente com possibilidades de resultados falso-positivos, isto é, uma falsa inclusão;

Erro humano e falha técnica: Geralmente conduz a resultados falso-negativos, isto é, erroneamente se exclui uma identificação ou uma paternidade positiva;

Fraude ou má índole: Pode-se esperar qualquer tipo de resultado, conforme a conduta moral e a consciência particular dos envolvidos.

16. O que é o DNA mitocondrial? Como ele auxilia na genealogia humana?

Ao contrário das demais organelas celulares, a mitocôndria dos animais, assim como o cloroplasto dos vegetais, apresentam genomas próprios. Dessa forma alguns poucos genes extranucleares estão presentes no homem na forma abundante de DNA mitocondrial, ou mtDNA. Abundante porque cada célula pode apresentar mais de 500 mitocôndrias e cada mitocôndria apresenta até 10 cópias de um mesmo cromossomo circular de 16569pb e 37 genes. Desta forma, o mtDNA em virtude da sua citada abundância celular, aliada à alta resistência à digestão enzimática do seu DNA circular, é especialmente indicado na análise molecular de amostras de material biológico que apresentem extremo grau de degradação, como em estudos de fósseis em



arqueologia, em análises de tecidos antigos, e até em reconstituição de desastres e casos criminais antigos como o caso da família Romanov (IVANOV, 1994).

O DNA mitocondrial apresenta uma característica muito importante. Durante a formação do zigoto, o espermatozóide contribui com uma cópia do genoma nuclear, enquanto o óvulo transmite a segunda cópia do genoma nuclear mais o genoma mitocondrial. Isto se deve ao fato de que os espermatozóides, embora também tenham mitocôndrias, não transmitem o mtDNA à célula-ovo. Explica-se: O espermatozóide tem uma única mitocôndria em sua cabeça, enquanto o óvulo tem milhares em seu enorme citoplasma. A mitocôndria paterna pode penetrar no óvulo, mas perde-se por diluição. A grande maioria das mitocôndrias não está localizada na cabeça do espermatozóide, mas norteiam os 11 microtúbulos do corpo da cauda: o axonema (GUYTON & HALL, 1997), conseqüentemente isto implica que, durante a fecundação, somente a cabeça, ou seja, apenas o material contido no capuz anterior e posterior do espermatozóide terá envolvimento com o material genético feminino, sendo todo o montante do material do espermatozóide descartado, inclusive as referidas mitocôndrias, o corpo, a peça principal e a peça terminal da cauda. Assim sendo, o genoma mitocondrial tem herança exclusivamente matrilinea, isto é, homens e mulheres herdaram suas

mitocôndrias de suas mães. Em suma, as mitocôndrias de uma tataravó materna, isto é, de uma mãe da mãe da mãe da mãe de uma pessoa devem ser necessariamente as mesmas desta, salvo da presença de mutações. Devido a sua maior taxa de mutação, cerca de dez vezes maior que o genoma nuclear, o mtDNA exibe muitas e consideráveis diferenças entre as espécies animais, tornando-se apto para esta tarefa também. O DNA mitocondrial é, na sua maior parte, idêntico, existindo, contudo, uma região de aproximadamente 1200pb (região *D-loop*), muito variável e, portanto, importante na individualização humana (FIG. 21). A metodologia utilizada na análise do DNA mitocondrial é a amplificação da região controladora *D-loop* pela PCR, seguido de seqüenciamento automático das regiões HV1 e HV2.

O DNA mitocondrial se serve também como um tipo de teste de paternidade e maternidade de longo alcance em genealogia matrilinea, assim como o cromossomo Y serve na linhagem patrilinea (FIG.22).

Para a Genealogia por DNA, polimorfismos localizados no DNA mitocondrial e no cromossomo Y, que está presente apenas em homens, permitem o estudo de linhagens humanas por causa das propriedades genéticas únicas destes dois compartimentos genômicos. Primeira particularidade, eles são herdados de apenas um dos genitores: o DNA mitocondrial é transmitido pela mãe para seus filhos e filhas, mas só



retransmitido para gerações posteriores pelas filhas mulheres. O cromossomo Y é transmitido através do espermatozóide paterno apenas para os filhos homens. Segunda particularidade, ao contrário dos demais cromossomos que estão presentes em duplicata, temos apenas uma única cópia genética do cromossomo Y e do DNA mitocondrial. Terceira particularidade, também ao contrário dos outros cromossomos, o cromossomo Y e o DNA mitocondrial, não tendo pares, não podem trocar e embaralhar seus genes, isto é, não sofrem a influência da recombinação cromossômica, e por este motivo, suas características genéticas são passadas em bloco para a próxima geração, estabelecendo linhagens que permanecem inalteradas a não ser que aconteça uma mutação genética, um evento incomparavelmente mais raro que a recombinação genética. As diferentes combinações de variações gênicas que tipificam um cromossomo Y ou um DNA mitocondrial são transmitidas em bloco e identificam cada linhagem. Estes blocos diferentes de variação são chamados haplogrupos. Os haplogrupos permanecem inalterados em linhagens paternas (cromossomo Y) ou linhagens maternas (DNA mitocondrial) até que ocorra uma mutação, constituindo assim, marcadores de linhagem extremamente úteis e informativos para a reconstrução do passado genético. Além disto, os dois complementam-se muito bem, fornecendo

informações separadas e independentes sobre as contribuições paterna e materna para a evolução das populações humanas (ALVES-SILVA *et al.*, 2000)

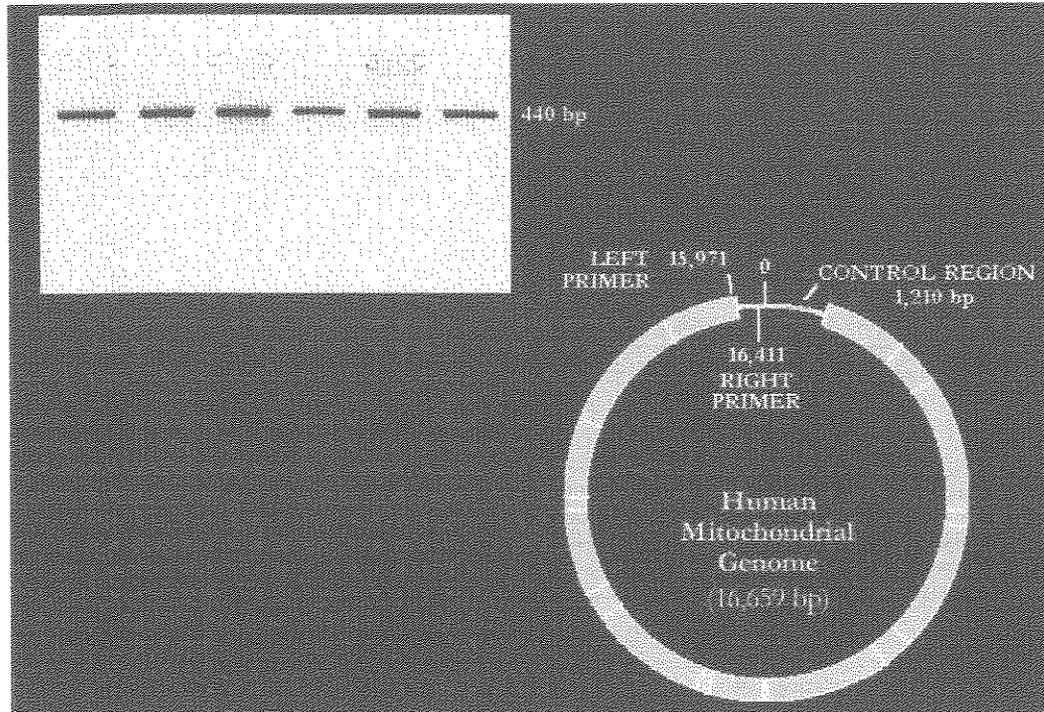


FIGURA 21 – Padrão alélico de 440pb em um *locus* hipervariável da região controladora D-loop(1210pb) do DNA mitocondrial humano

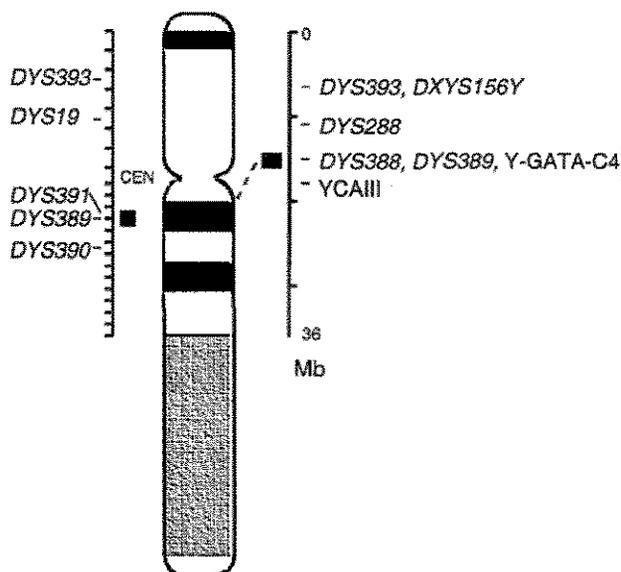
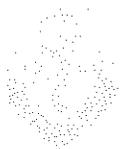


FIGURA 22 – Cromossomo Y e alguns dos seus *loci* STR mais comumente estudados

Fonte: *Nucleic Acids Res.* 28(2), e8 (2000) **B. Perguntas de âmbito estatístico:**

17. A metodologia de análise e cálculo para investigação de paternidade é igual para identificação criminal?

A partir do pressuposto de que em um caso criminal, geralmente uma amostra de local de crime é comparada com um possível autor da mesma, a base de interpretação para os casos de identificação, criminal ou *post-mortem*, necessariamente será a coincidência de todas as freqüências alélicas entre amostra e suspeito, ou seja, 100% do padrão genético. Já nos casos de investigação de paternidade os métodos de cálculo devem considerar outros pressupostos e variações, como a possibilidade de mutação meiótica. Além do mais, a base de interpretação em um caso de investigação de paternidade está na dependência da obediência das leis mendelianas de hereditariedade,

onde 50% do material genético de um filho provém de sua mãe biológica (geralmente é tido como certa) e a outra metade provém de seu pai biológico (geralmente é tido como suposto nestes casos). Desta forma, para cada *locus* verifica-se a presença do alelo de origem paterna do filho no genótipo do suposto pai. Sendo assim, a investigação para os casos de paternidade necessariamente será baseada na coincidência de exatamente metade das freqüências alélicas entre amostra (filho) e suspeito (suposto pai), ou seja, 50% do padrão genético (FIG.23 e 24). Conseqüentemente as metodologias de cálculo são diferentes.

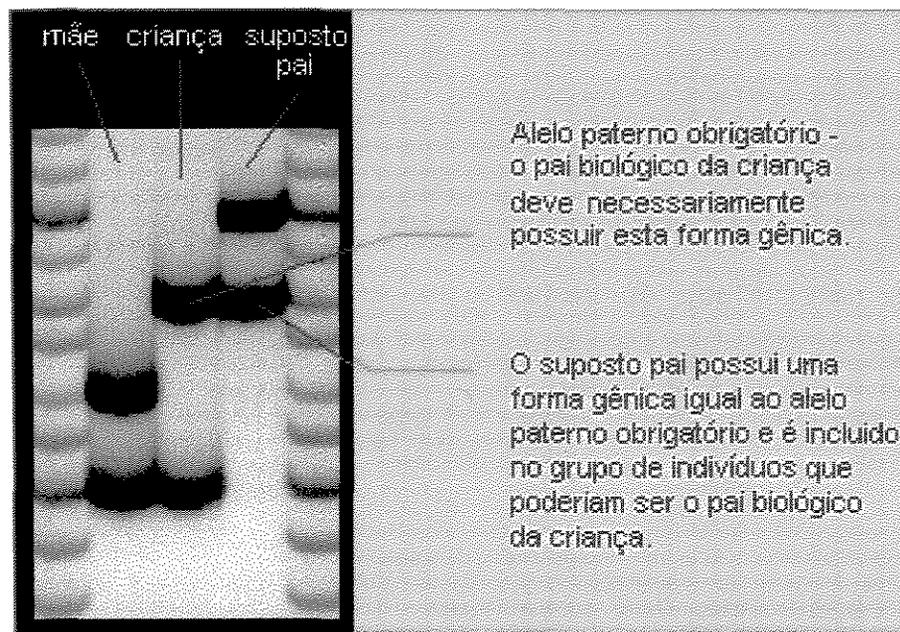


FIGURA 23 - Padrão alélico em um *locus* onde houve inclusão de paternidade

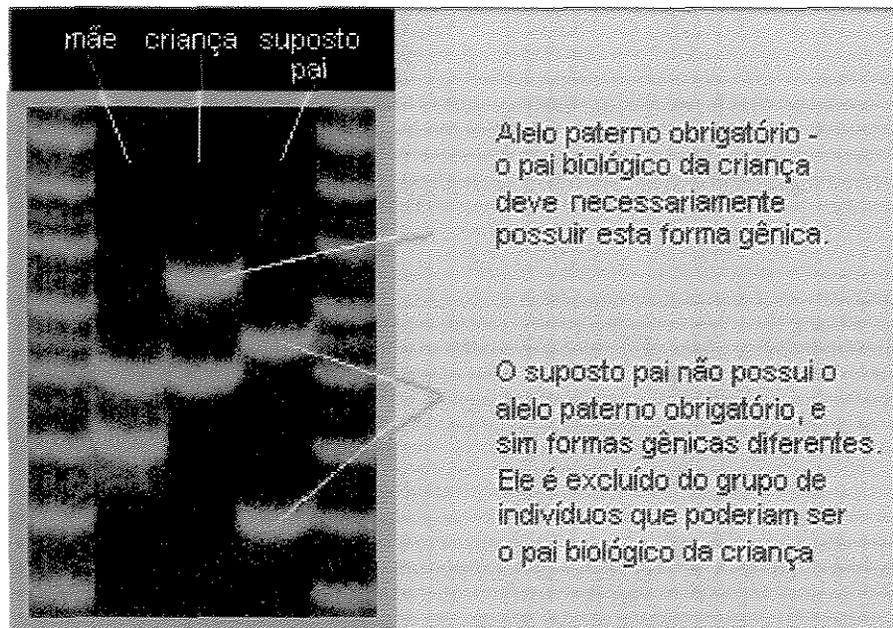
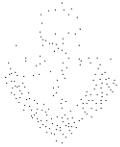


FIGURA 24 – Padrão alélico em um *locus* onde houve uma exclusão de paternidade

18. O que é IP, W, PE? Para que eles servem?

Segundo a Associação Americana de Bancos de Sangue AABB (AMERICAN...1998):

O ÍNDICE DE PATERNIDADE (**IP**) é uma indicação de quantas vezes é mais provável a paternidade do alegado pai em comparação com a de um outro indivíduo aleatoriamente escolhido na população.

$$\text{IP} = \text{X/Y}$$

Onde:

X é a probabilidade das evidências genéticas serem favoráveis a paternidade em questão. Sendo assim, pode-se concluir que **X** é a probabilidade do trio ser verdadeiro (existir vínculo genético entre o homem analisado e o requerente).

Y é a probabilidade das evidências genéticas não serem favoráveis a paternidade em questão. Sendo assim, pode-se concluir que **Y** é a probabilidade do homem analisado tornar o trio falso (não existe vínculo genético entre o homem analisado e o requerente).

O índice de paternidade (**IP**) é particular de cada *locus* e é calculado a partir da frequência alélica em uma dada tabela populacional do alelo de origem paterna do filho presente no suposto pai. Quando não há *matching* ou coincidência do alelo de origem paterna do filho com pelo menos um dos alelos do suposto pai para um dado *locus*, estamos diante de uma possível exclusão de paternidade.

O índice de paternidade combinado (**IPC**) nada mais é que a multiplicação de todos os índices IP de cada *locus*, baseado sobretudo na regra da multiplicação e no pressuposto que os *loci* selecionados estão em equilíbrio de ligação. Desta forma um produto acima de 10000, segundo a AABB é considerado praticamente uma inclusão de paternidade.

A **PROBABILIDADE DE PATERNIDADE (W)** é a estimativa de o indivíduo analisado, a partir de evidências genéticas, ser o pai biológico do requerente. Sendo assim, o termo probabilidade, assumirá um sentido um pouco diferente, já que por se tratar de uma probabilidade deveria estar baseado tanto em evidências genéticas como em evidências não genéticas (total de eventos).

As evidências não genéticas provêm de testemunho da mãe ou de qualquer outra pessoa, análise do suposto pai, etc. Devido à dificuldade de se avaliar a veracidade dos testemunhos para a obtenção das evidências não genéticas, considera-se a probabilidade *a priori* de paternidade. Para a probabilidade *a priori* (não considerando nenhuma



informação sobre o caso) atribui-se valor igual a 0,5, indicando que antes de qualquer evidência genética, o indivíduo a ser analisado tem 50% de chances de ser o pai do requerente. As evidências genéticas provêm da análise do laboratório.

Usando-se o teorema de *Bayes* calcula-se a **PROBABILIDADE DE PATERNIDADE** combinando-se os dois tipos de evidências. Pelo teorema obtêm-se:

$$W = \frac{IP \cdot p}{IP \cdot p + 1 (1 - p)}$$

Considerando a probabilidade *a priori* (p) universalmente aceita como igual a 0.5 (ou 50%), conclui-se:

$$W = \frac{IP}{IP + 1}$$

O **PODER DE EXCLUSÃO (PE)** é definido como a probabilidade de se excluir um indivíduo aleatoriamente escolhido da população, tendo como conhecidos os alelos da mãe e do requerente. Sendo assim, **PE** será igual a freqüência dos alelos de todos os homens (não considerando a raça do indivíduo) que obrigatoriamente não serão compartilhados com o requerente ou que não serão considerados como alelos paternos.

PE pode ser calculado usando a equação:

$$PE = 1 - (a^2 + 2ab)$$

Onde,

a é a frequência dos alelos herdados pela criança do pai biológico.

b é a soma das frequências de todos os alelos que não são os paternos.

Sendo assim, (**b = 1 - a**).

a² + 2ab é a frequência de todos os possíveis pais.

Considerando todas as informações acima, conclui-se:

$$PE = (1 - a)^2$$

Obs.: Em casos em que a mãe e o requerente compartilham os dois alelos, não é possível determinar o alelo paterno. Sendo assim, **PE** será calculado considerando todos os homens que apresentem um dos alelos. Nesse caso a equação usada é:

$$PE = (1 - [a_1 + a_2])^2$$

Onde,

a₁ + a₂ é a soma das frequências dos dois alelos do requerente (alelos compartilhados com a mãe).

19. Como são baseados os métodos de cálculo e probabilidade dos exames em DNA?

A verificação de que duas amostras de tecido humano diferem em seus padrões de DNA leva à conclusão de que as duas vieram de pessoas diferentes. Entretanto, se as duas amostras forem indistinguíveis com relações aos padrões de DNA detectados, duas possibilidades existem: as duas amostras vieram da mesma pessoa (ou mais raramente de



gêmeos monozigóticos) ou as duas amostras vieram de pessoas diferentes cujos padrões de DNA nas regiões-alvo pesquisadas são as mesmas. Essas duas possibilidades não podem ser distinguidas. Para proporcionar à pessoa que julga a questão, um juiz, por exemplo, informação suficiente para avaliar as duas possibilidades, tem sido tradição usar estatísticas de genética populacional para estimar a fração de pessoas na população que têm uma certa combinação de padrões de DNA (COMMITTEE...1992). Qual é a chance de se pegar ao acaso uma pessoa que tenha os mesmíssimos padrões genéticos (nos casos criminais) ou que combine com 100% dos alelos paternos (nos casos de investigação de paternidade) com a amostra-problema? Obviamente, quanto menor a probabilidade, mais forte é a inferência de que a amostra em questão está associada a uma certa pessoa que tem esses padrões. Desta forma, a questão chave com relação a tipagem forense do DNA é: qual é a probabilidade de que uma pessoa tomada ao acaso combine com a amostra problema quanto aos padrões de DNA? Atualmente existem derivações deste problema, onde se questiona qual a proporção de pessoas que na mesma população de um suspeito tenha a mesma combinação de padrões de DNA que a amostra problema, ou nos casos em que se necessite de cálculos mais específicos em uma população comprovadamente sub-estruturada, típico de sub-populações

com casamentos consangüíneos e endogâmicos como a Índia. Também nos casos onde se tem suspeita de que o autor da amostra problema pode ser um parente próximo de um acusado, os métodos de cálculo de probabilidade devem ser mais rigorosos e conservadores.

As freqüências populacionais dos padrões em vários *loci* são multiplicadas juntas, na suposição de que sejam independentes, isto é os *loci* em questão estão em equilíbrio de ligação. Com a experiência da genética populacional adquirida com os grupos sangüíneos e marcadores de enzimas e HLA, indicando que cada alelo específico pode variar amplamente entre as populações, tornou-se extremamente indicado e importante escolher a população certa com a qual será comparado o DNA de um certo suspeito. A versatilidade da informática em se ajustar de forma específica às mais diversas necessidades do dia a dia, agilizou e mesmo automatizou as complicadas análises estatísticas requeridas para os testes em DNA. Os programas atualmente disponíveis realizam os principais cálculos estatísticos a partir das mais diversas tabelas de freqüências alélicas, como o *Filer Maker Program*® para VNTR/RFLP (FIG. 25). Ressalta-se que a aplicação de cálculos estatísticos a partir de banco de dados que utilizem amostras de população nacional é a metodologia atual de eleição e a mais bem indicada para esse fim.

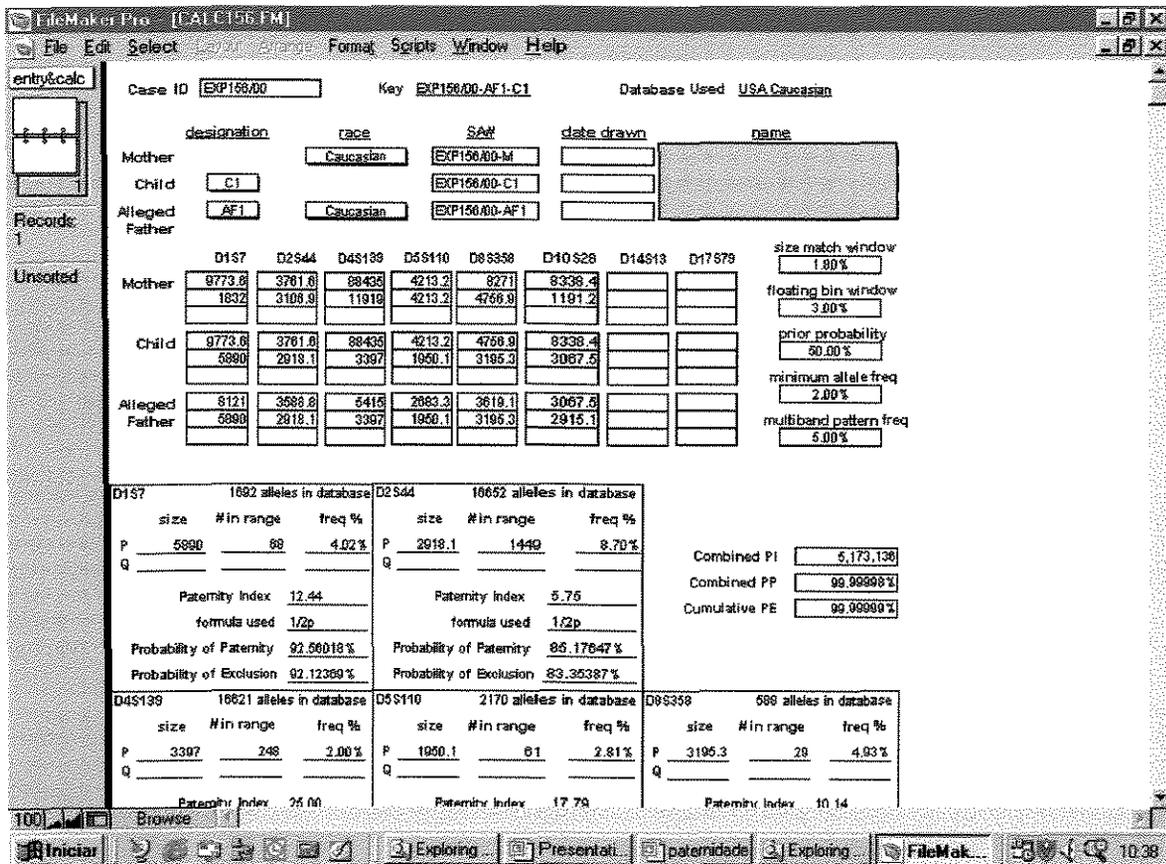


FIGURA 25 – Programa de cálculos estatísticos para freqüências alélicas em VNTR

Fonte: Laboratório Exact Gene – Campinas(SP)

Em um sistema dialélicos, isto é, que contenha dois alelos para cada *locus*, o número de conjuntos ou genótipos possíveis é dado pela fórmula $[n(n+1)/2]$, onde n é o número de alelos possíveis. Assim, em um sistema de dois alelos o número de genótipos possíveis são 3.

Quando se interpretar uma tabela de freqüência alélica, deve se ter em mente que quanto maior for o número de alelos de um sistema e quanto mais uniforme for a distribuição dos mesmos, mais informativo será o *locus*. Por isso a escolha de um conjunto de *loci* mais polimórfico é

primordial para a obtenção de um sistema mais informativo. Além do mais, quanto maior for o número de sistemas analisados, melhor será o produto da multiplicação, e conseqüentemente o resultado.

Existem relevantes considerações a serem feitas em relação aos cálculos de probabilidade. Um dos problemas mais comuns se refere aos experimentos científicos que demonstram que o poder de exclusão ou de inclusão teóricos de um dado sistema é relativamente menor do que os valores obtidos na prática, inclusive no Brasil (PENA, 1995; GRATTAPAGLIA, 2000). Isso se deve a diversos fatores populacionais, como a presença de pequenas sub-estruturas em nossa população, e que deve ser considerada na prática. Um outro problema mais sério é que a maioria esmagadora dos métodos de cálculo de probabilidade de paternidade ou de identidade não leva em consideração o risco e a possibilidade de troca de amostras, de falha técnica humana, da presença de mutação nos sítios de anelamento dos *primers* em STR/PCR, da eventual subdigestão das enzimas de restrição em VNTR/RFLP, do errôneo flanqueamento ou acoplamento devido à falta de especificidade associativa de um *primer*, entre outros.



C. Perguntas de âmbito jurídico:

20. Quais dados devem obrigatoriamente estar presentes no laudo de teste de determinação de paternidade ou identificação?

Segundo recomendações adaptadas de RASKIN (1998):

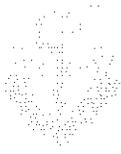
- Técnica empregada de DNA e principais materiais utilizados;
- Nome dos *loci* ou pontos testados;
- Tamanho dos fragmentos alélicos encontrados ou número de repetições;
- Data da coleta da(s) amostra(s);
- Número-código do caso, utilizado pelo laboratório;
- Nome do(s) indivíduo(s) testado(s) e o parentesco entre si, além das fotos dos envolvidos;
- Origem étnica de cada envolvido;
- Os genótipos estabelecidos para cada indivíduo em cada um dos *loci* examinados. A descrição alélica dos padrões de PCR deve ser baseada no número de unidades repetidas;
- Uma declaração objetiva se o suposto pai pode ou não ser excluído de ser o pai biológico, nos casos de investigação de paternidade;
- Uma declaração objetiva se o suspeito ou a vítima pode ou não ser excluído de ser o mesmo da amostra problema, nos casos criminais;

- Nos casos de inclusão em investigação de paternidade devem constar o Índice de Paternidade individual para cada sistema, o Índice de Paternidade combinado de todos os marcadores, a probabilidade de paternidade em porcentagem e a probabilidade *a priori* utilizada para calcular a probabilidade de paternidade;
- Nos casos de identificação humana direta devem constar a probabilidade de identidade e a probabilidade de identidade acumulada.
- A assinatura do responsável pelo laboratório.

21. O que é o DNA virtual para investigação de paternidade?

Tem surgido uma nova modalidade publicitária a fim de se granjear novos clientes neste mercado que movimenta mais de R\$15 milhões por ano; é o chamado DNA virtual. O DNA virtual consiste em mais um *e-business*, pois é propriamente uma transação eletrônica via *internet*, na qual se acessa uma determinada *homepage* e requisita-se serviços *on-line*, isto é, solicita-se um kit de coleta de swab bucal pelo correio. Após o recebimento, o próprio cliente coleta as amostras desejadas, envia as amostras pelo correio ao laboratório virtual, e recebe posteriormente um laudo com os resultados da análise.

A rigorosa discrição requisitada por alguns indivíduos encontrou seu refúgio nesta nova modalidade, onde o sujeito sequer tem um contato visual com o laboratório, não se expõe à sociedade ou a mídia, pode



ocultar todos os seus atos e precedentes, e finalmente pode ainda obter seus resultados morais conclusivos. Este valor moral, desde que confie plenamente nos resultados do laboratório, é certo e líquido para o indivíduo. Contudo o valor legal deste método é totalmente nulo, pois a prova testemunhal está totalmente comprometida, principalmente nos casos judiciais onde existe a necessidade de testemunhas de ambas as partes. Além do mais, para o exame ter valor legal, além de requisitado pela autoridade competente, ele deve ser documentado em cada etapa laboratorial, desde a coleta do material biológico, as fotografias, a identificação do caso e das amostras, até as assinaturas. Se o laboratório não pode sequer atestar a origem do produto coletado, nem mesmo a forma como isso foi realizada, como ele poderá responder profissionalmente pelos resultados do exame? Resumidamente esta modalidade serve exclusivamente para uma averiguação empírica ou experimental, podendo ocasionalmente assumir um grande valor particular ao cliente oculto.

22. Como são realizados os controles de qualidade?

Várias são as instituições que atualmente realizam controle de qualidade e proficiência, em especial na América do Norte e na Europa, como a *American Association of Blood Banks (AABB)*, o *Grupo Espanhol e Português da International Society in Forensic Genetics (GEP-ISFG)*,

Standards Reference Material of National Institute of Standards and Technology (NIST-SRM), International Society of Forensic Hematology (ISFH), Standards of DNA Profiling in European (STADNAP), e muitos outros. Todos eles têm um objetivo comum: a conquista de uma uniformidade nos padrões mínimos de qualidade. De certa forma, as metodologias de controle empregadas por esses grupos são semelhantes entre si, existindo requisitos mínimos para se poder filiar aos grupos, como, por exemplo, o diretor científico do laboratório ou instituição deve ter requisitos curriculares mínimos. Há uma série de exigências de controle de qualidade interno e de estrutura física, além de um ensaio, que é o controle prático externo, comum e igual a todos os participantes, nesse caso, podendo participar inclusive laboratórios estrangeiros de diversos países. No Brasil ainda não existe uma legislação específica para esses casos, nem tampouco um órgão governamental competente para normatizar esta tecnologia no país, em especial sob o ponto de vista do controle legal e técnico. Nesses últimos anos, contudo, entidades não governamentais como a Sociedade Brasileira de Medicina Legal (SBML), a Sociedade Brasileira de Investigação Genética (SBIG) e a Sociedade Brasileira de Genética (SBG) têm se esforçado no objetivo de se implantar um rígido e idôneo controle de qualidade no país, pelo menos entre seus associados, seja



através de normas técnicas de procedimentos, seja através de ensaios práticos de avaliação de desempenho, além de planejarem uma maior influência política nesse sentido.

Algumas recomendações abaixo são transcritas da SBIG:

- Realização de testes confirmatórios feitos por laboratório independente, para todos os sistemas genéticos utilizados para os testes;
- Registro de todas as informações relativas à identificação, incluindo o nome, RG, local e data de nascimento, relacionamento ou suposto relacionamento familiar entre os indivíduos testados, etnia, local e data de coleta das amostras;
- Identificação das amostras por uma etiqueta de aderência firme contendo uma identificação única para cada indivíduo;
- Presença de testemunhas na coleta;
- Armazenamento de amostras de forma a evitar contaminações, adulterações ou substituições;
- Respeito à privacidade dos indivíduos que estão sendo testados.

23. *Se na constituição, está escrito que ninguém está obrigado a fornecer provas contra si mesmo, como se analisa a intimação para fornecimentos de material biológico em um caso de investigação de paternidade ou mesmo de um caso criminal?*

Até pouco tempo atrás, os antigos exames de vínculo genético apresentavam-se pouco conclusivos, não afastando a presunção de paternidade nos casos onde não existiam exclusões. Desta forma, ganharam notoriedade diversas modalidades de defesa dos Requeridos como a exceção de múltiplo concubinato, bem como a má conduta notória da mãe do investigante, além da impossibilidade física do Requerido, dos quais destaca-se a impotência sexual e a esterilidade masculina. Segundo SIMAS FILHO (2000), após novembro de 1994, mais uma nova modalidade de defesa controversa surgiu no âmbito da investigatória: a recusa do Requerido em submeter-se ao exame de DNA. Decisão emanada do Supremo Tribunal Federal, de que "ninguém é obrigado a submeter-se a exame de sangue para comprovação de paternidade", fulcrada no dispositivo constitucional do Inc. II, art. 5º, fez nascer nos Requeridos, essa possibilidade extremada de escapar de uma condenação, não só jurídica, mas biológica. A existência dessa recusa, por parte do réu, configura um paradoxo, se por um lado pode-se determinar com segurança a paternidade e a não paternidade, através do exame do DNA, isso de nada servirá se o Requerido recusar a fazê-lo. Evidentemente que uma recusa dessa natureza, nessa fase processual, fará nascer uma presunção de paternidade. O ônus da prova, na investigatória é muito mais do Requerido que do Requerente.



“Não pode, ao nosso entender, o Requerido negar-se à submissão aos exames científicos para a apuração da verdade! É aspecto puramente potestativo, e nesse caso, analogamente às condições puramente potestativas, proibido!” (SIMAS FILHO, 2000).

A jurisprudência brasileira tem-se portado claramente contra esse tipo de atitude, pois havendo recusa, a presunção de paternidade pode ser considerada como prova, em conjunto com outros elementos probantes nos autos. Igualmente não cabe ao réu oferecer recusa à submissão à retirada de sangue para o exame genético, uma vez que este pode ser feito nas células da mucosa bucal, retiradas sem dor, através de esfregação bucal com bastonetes (SIMAS FILHO, 2000).

Da mesma forma o investigado sabe que pouco ou nada lhe adiantará alegar o múltiplo concubinato ou a má conduta notória da mãe do autor, porque o DNA dirimirá todas as dúvidas. Quanto à alegação de sua impossibilidade física (impotência sexual, esterilidade ou vasectomia) de haver mantido relações sexuais com a mãe do autor, além das demais expressões de defesa, fica o Requerido com alegação e conseqüente ônus de provar essas situações.

Alguns especialistas como SIMÕES (2000), preconizam, nos casos de comprovação de múltiplo concubinato da mãe do investigante, e nos casos onde o investigado se apresentava vasectomizado na época em

que mantinha núpcias com a mãe do investigante, que se utilize certos índices conservadores nos cálculos de paternidade, para que possam indiretamente favorecer ao réu; tais como: dividir o índice de paternidade pelo número de parceiros que a concubina manteve na semana de concepção, ou dividir o índice de paternidade por um índice constante nos casos dos vasectomizados. Finalizando, para a obtenção de um novo índice de paternidade satisfatório, bastaria a realização de uma nova bateria de *loci* e/ou sondas adicionais, até se atingir novamente um nível de paternidade satisfatório, obviamente isto seria indicado somente nos casos onde não houve exclusão em nenhum sistema.

24. *Quais são os padrões de admissibilidade, aplicabilidade no Brasil para estes exames?*

Infelizmente a ordem não acompanha o progresso. A herança de uma cultura que necessita moldar-se em outra, como a norte-americana, faz com que o desenvolvimento de padrões próprios, de metodologias ou de grandes descobertas seja uma atividade rara no Brasil. Poucas são as circunstâncias adaptativas que o país lança em benefício próprio, não existindo o costume do país desenvolver seus próprios meios para as suas próprias e reais necessidades. As técnicas em DNA são meramente



mais um exemplo da implantação de um sistema de admissibilidade, decorrente da herança dos padrões desenvolvidos no exterior.

Os principais moldes para a aplicabilidade e admissibilidade destas provas foram desenvolvidos na Europa, em especial na Inglaterra que foi o berço destas descobertas, e logicamente nos Estados Unidos através dos órgãos governamentais e de inúmeros grupos, associações, institutos de estudos e de controle de qualidade, como *Federal Bureau of Investigation (FBI)*, *American Association of Blood Banks (AABB)*, *International Society of Forensic Hematology (ISFH)*, *National Institute of Justice (NIJ)*, *National Institute of Standards and Technology (NIST)*, *National Research Council (NRC)*, *Technical Working Group in DNA Analysis Methods (TWGDAM)*, entre muitos outros. Especificamente nos Estados Unidos, a admissibilidade nos tribunais, quando da utilização inicial desta técnica por laboratórios particulares na segunda metade da década de 80 e em 1988 pelo FBI em seu primeiro caso criminal, passou amplamente a ser discutida. Tendo em vista as vantagens oferecidas por estas técnicas, além das inúmeras conclusões positivas dos grupos e associações de especialistas desta área em relação à validade científica destas provas, o caráter de regulamentação das técnicas em DNA baseou-se em dois testes principais para a admissibilidade da informação científica pelos especialistas. Um é o teste *Frye* que diz que

a admissibilidade depende da qualidade da ciência que fundamenta a evidência, segundo a visão dos próprios cientistas. O outro é teste da admissibilidade de acordo com o padrão de utilidade, o qual prega uma abordagem mais flexível, onde a admissibilidade de uma prova, através do regulamento 702, está diretamente relacionada com a sua utilidade técnica e científica, desde que haja equilíbrio da força probativa do método em questão contra seu potencial de má aplicação por parte do júri, conforme regulamento 403. Desta forma, os dois testes consagraram de maneira conclusiva e objetiva a admissibilidade das tipagens de DNA perante a lei e os tribunais. Atualmente vários estados americanos já promulgaram leis que obrigam essencialmente a admissão da evidência por tipagem do DNA, sendo hoje amplamente aceito e regulamentado nos tribunais daquele país, como na Europa ocidental e, por conseguinte no Brasil.

⁸VALLE (1999), aborda alguns aspectos de admissibilidade e aceitação desses exames pela sociedade. Nesse trabalho analisa principalmente as questões de regulamentação dos testes de DNA do ponto de vista da técnica e dos aspectos éticos envolvidos, propondo um modelo de padronização baseado principalmente na Lei de Biossegurança:

O célere aperfeiçoamento de uma das ferramentas que se utiliza da moderna biotecnologia conhecida por Engenharia Genética, está permitindo à sociedade

⁸ VALLE, S. (Coordenadoria de Biossegurança da Fundação Oswaldo Cruz) **Correspondência trocada.** 1999



perceber os primeiros impactos resultantes das pesquisas básicas no campo da biologia molecular ocorrida nos últimos 20 anos.

No Brasil, a indústria de identificação de paternidade por DNA tem faturado milhões de reais todos os anos. Um outro campo de aplicação cada vez mais emergente é a área criminal, pois a técnica permite elucidar crimes, condenando reais criminosos e absolvendo inocentes. Mas uma pergunta precisa ser feita, quem valida e certifica esses testes?

A velocidade na incorporação de conhecimento tecnológico em linguagem acessível é de fundamental importância para legisladores e juristas e em especial para sociedade. Por exemplo, a técnica de PCR, apesar de recente, já está sendo substituída pela RCA (*Rolling Circle Amplification*), que utiliza vírus para fazer a cópia do DNA, com uma velocidade muito superior e em baixas temperaturas. A confiabilidade e a segurança dos testes de identificação por DNA, quando da utilização da Engenharia Genética, podem ser equacionados pela Lei de Biossegurança (Nº 8.974/95):

"Art. 1º - Esta lei estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização no uso das técnicas de engenharia genética na construção, cultivo, manipulação, circulação, comercialização, consumo, liberação e descarte de Organismo Geneticamente Modificado (OGM), visando proteger a vida e a saúde do Homem, dos animais e das plantas, bem como o meio ambiente."

e pelo seu decreto de regulamentação (Nº 1.752/95), que normatiza as atividades da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio:

"Regulamenta a Lei nº 8.974, de 05 de janeiro de 1995, dispõe sobre a vinculação, competência e composição da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, e dá outras providências."

Aspecto relevante desta legislação é que a mesma protege a saúde dos Homens, animais, vegetais e do meio ambiente sem hierarquizar a proteção. Em suma,

a Lei de Biossegurança regulamenta todos os procedimentos laboratoriais que envolvam qualquer tipo de DNA, seja humano, animal, vegetal, transgênico e até mesmo quimeroplástico.

Qualquer instituição domiciliada no País e que utilize técnicas de Engenharia Genética deve possuir o Certificado de Qualidade em Biossegurança - CQB por força da lei Nº 8.974/95:

"Art. 2º § 3º - As organizações públicas e privadas, nacionais, estrangeiras ou internacionais, financiadoras ou patrocinadoras de atividades ou de projetos referidos neste artigo, deverão certificar-se da idoneidade técnico-científica e da plena adesão dos entes financiados, patrocinados, conveniados ou contratados às normas e mecanismos de salvaguarda previstos nesta Lei, para o que deverão exigir a apresentação do Certificado de Qualidade em Biossegurança de que trata o art.6º, inciso XIX, sob pena de se tornarem co-responsáveis pelos eventuais efeitos advindos de seu descumprimento."

O decreto de regulamentação Nº 1.752/95 também dá competência à CTNBio para estabelecer o Código de Ética de Manipulação Genética:

"Art. 2º Compete à CTNBio:

.....
IV - propor o Código de Ética de Manipulações Genéticas;"

Não bastasse o referido decreto, a sociedade ainda dispõe da Resolução Nº 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, ligado ao Ministério da Saúde, que estabelece os procedimentos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, e o faz de maneira participativa, pois prevê a criação de Comissões de Ética em Pesquisa, com participação de leigos e de membros não pertencentes à instituição proponente da pesquisa.

"VII - Comitê de Ética em Pesquisa - CEP



Toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa.

VII.1 - As instituições nas quais se realizem pesquisas envolvendo seres humanos deverão constituir um ou mais Comitê de Ética em Pesquisa - CEP, conforme suas necessidades.

VII.2 - Na impossibilidade de se constituir CEP, a instituição ou o pesquisador responsável deverá submeter o seu projeto à apreciação do CEP de outra instituição, preferencialmente dentre os indicados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS)."

Certamente, essas normas não atendem à necessidade do direito penal, mas poderão ser muito úteis. Sua aplicação poderá fornecer subsídios para uma futura jurisprudência ou até mesmo uma legislação sobre o tema.

Devido ao enorme potencial das biotecnologias, e da sua possível e previsível associação com as ciências da computação no desenvolvimento de biochips, existirá a necessidade constante da sociedade cobrar pelos diversos mecanismos existentes, em especial no campo legislativo e jurídico, uma aplicação que seja técnica e economicamente sustentável, mas principalmente, socialmente adequada.

Com relação às questões éticas, temos que ficar atentos e refletir quando um país como os Estados Unidos aplicam de 1 a 5% do orçamento da biotecnologia em estudos de segurança da Engenharia Genética, e em contrapartida os investimentos em bioética chegam a um total de 10%.

A ponta desse *iceberg* pode ser visualizado quando encontramos estudiosos da bioética mais liberais com relação ao uso da Engenharia Genética do que muitos cientistas, que, em diversos momentos, consideram a necessidade de uma melhor avaliação dos impactos tecnológicos. Certamente com investimentos em bioética é possível condicionar a sociedade e familiarizá-la com a tecnologia, em contrapartida em

biossegurança, além dos elevados custos das pesquisas, corre-se o risco de evidenciar as falhas da tecnologia.

No ordenamento jurídico da identificação por DNA existe a necessidade de uma participação transdisciplinar e multicientífica, até porque num futuro próximo com a introdução na prática médica da terapia genética, poderemos encontrar marcadores genéticos de outras espécies no genoma humano e vice-versa.

Apesar de todas as iniciativas já tomadas para controlar os efeitos negativos da biotecnociência a sociedade necessita ficar atenta. Portanto existe a necessidade de investimentos em nossas universidades e centros de pesquisa para estabelecer uma competência nacional em biotecnologia.

25. O que a lei prevê para estes exames? O que o governo pode fazer?

A lei estadual 9.934, de 16 de abril de 1998, do estado de São Paulo obriga a realização dos exames de investigação de paternidade pelas técnicas em DNA gratuitamente nos casos judiciais e abre precedentes também para os casos de identificação criminal. Apesar do caráter bem-intencionado desta lei, a sua aplicabilidade está seriamente comprometida, pois além de estar limitada ao estado de São Paulo, existem relevantes empecilhos à sua efetiva implantação, principalmente os motivos relacionados à deficiência de estruturação física, econômica, técnica e científica das instituições públicas designadas para tal fim. Essa impraticabilidade resume-se



principalmente pelo alto custo operacional dos testes em DNA e pela demanda de mão de obra altamente qualificada para a realização destes exames. Hodiernamente, por parte do governo, ainda não existe uma legislação específica que regularmente o exercício dos exames em DNA com fins de análise de vínculo de parentesco ou identificação humana. Várias são as propostas e anteprojetos que já foram encaminhados ao congresso visando a regulamentação da genética forense no nosso dia a dia, contudo sem ainda obter os frutos. Todavia com o término da primeira etapa do sequenciamento do genoma humano, além da maior expectativa em torno destes exames, tornou-se mais imperativo a sua regulamentação, a ponto de alguns parlamentares, como o Senador Sebastião Rocha enviar anteprojeto de lei visando o resguardo do sigilo das informações genéticas, a proibição da clonagem humana e o controle dos resultados dos exames em DNA. Isto ainda é muito pouco, pois se necessita emergencialmente de uma completa normatização destes exames, tanto do ponto de vista ético, legal e profissional, assim como de um rigoroso controle técnico das entidades que exercem estas atividades. Portanto, a padronização ou *standardização* dos exames a requisitos mínimos de qualidade é a principal medida que o governo, através de seus órgãos competentes como o Inmetro, poderia realizar em prol da sociedade e da ciência.

26. Seria adequado implantar um banco de dados de DNA com amostras de locais de crimes e de delituosos no Brasil?

É extremamente complicado discutir qualquer inovação tecnológica sem mesmo antes do país ter realizado seu dever de casa. Não se pode discutir a implantação de um banco de dados de DNA, se nem mesmo a efetiva utilização dos bancos de dados dactiloscópicos sequer é realizada. É fato conhecido que nem os bancos de dados dactiloscópicos da Polícia Militar, das Forças Armadas, da Polícia Civil e nem dos cidadãos em geral são integrados entre si em uma mesma cidade, muito menos entre os estados. Os bancos de dados dactiloscópicos são extremamente úteis, pois permitem, com simplicidade, a um baixo custo e a um tempo bastante hábil, averiguar indícios e vestígios em locais de crime de uma forma bastante segura. Sendo assim, o principal motivo para se desenvolver um banco de dados de DNA, seria nos casos de presença de amostras biológicas em locais de crimes, sejam de vítimas sejam de delituosos, principalmente os reincidentes de estupro. A implantação de um banco de dados deste tipo, e a nível nacional, resolveria de maneira bastante convincente determinados tipos de crimes, em especial onde haja vestígios de material humano no local do crime.



No Reino Unido, desde 1995 a FSS utiliza-se de banco de dados de criminosos para fins de investigações criminais chamado *UK DNA Database*, isto é, banco de dados de DNA do Reino Unido. Nos Estados Unidos, desde outubro de 1998 funciona o CODIS Database, um sistema desenvolvido pelo FBI com 13 *loci* STR e um *locus* identificador de sexo (amelogenina) (FIG.26). É um sistema bastante sofisticado e organizado, com um banco de dados com mais de 600.000 indivíduos, integrado entre os 50 estados da nação e baseado em STR/PCR.

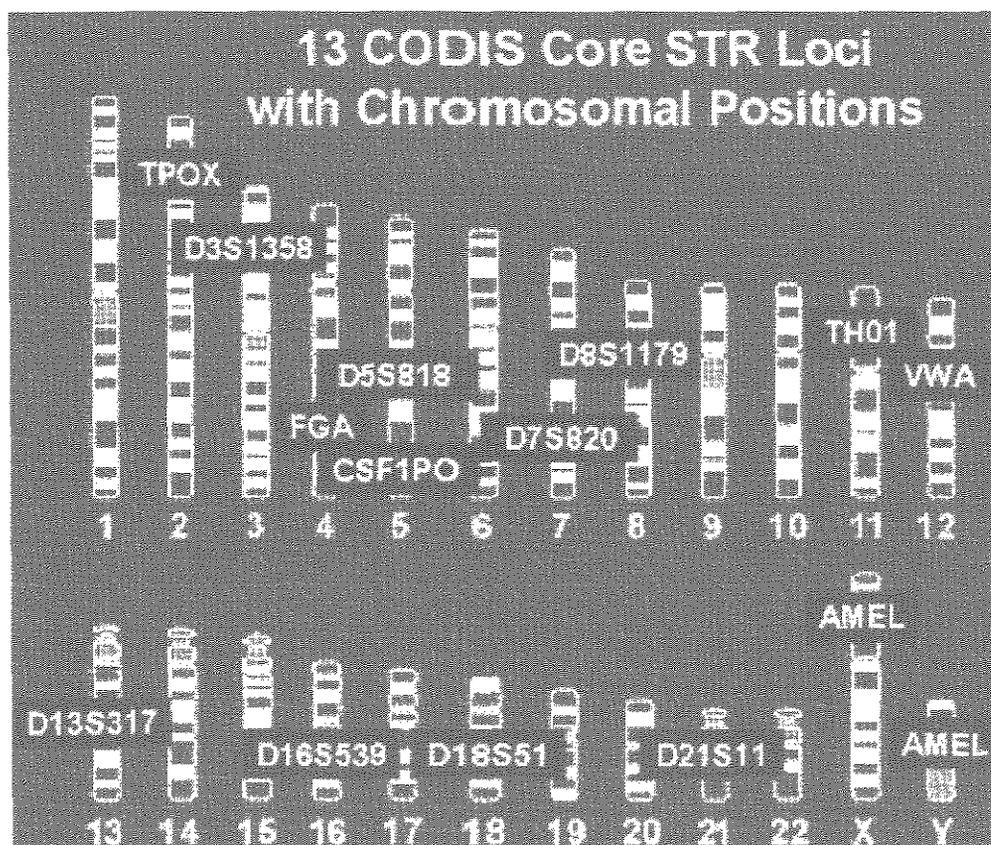
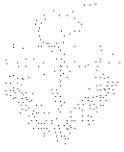


FIGURA 26 – Mapa cromossômico do CODIS - *Combined DNA Index System*

Fonte: FEDERAL...2001

27. Como o juiz deve interpretar uma perícia em DNA?

Os exames em DNA não vieram substituir integralmente os exames tradicionais, como a dactiloscopia, as técnicas antropológicas e os exames médico e odonto-legais, nem mesmo medir forças com eles, mas sim como uma forma de auxiliar e suprir as deficiências dos métodos tradicionais. Como qualquer outro método, os exames em DNA apresentam suas desvantagens e riscos que devem ser perfeitamente esclarecidos a todos. O custo de um exame de DNA, o tempo de trabalho que despense até a obtenção dos resultados e a complexidade das técnicas são exemplos claros de algumas das limitações destes exames. Desta forma, quando um criterioso exame odontológico obtiver os requisitos mínimos para identificar uma ossada, por exemplo, ou quando um exame sorológico tradicional exclui conclusivamente uma paternidade, porque se indicaria a realização de mais uma prova dispendiosa e onerosa? O DNA não deve subjugar a lei, mas a lei a ele. Por outro lado é de largo conhecimento jurídico que, segundo o Código de Processo Civil, o Juiz não deve ficar adstrito ao laudo, portanto ter ciência dos requisitos fundamentais que podem influenciar na validade de um resultado de uma teste em DNA, bem como saber questionar a idoneidade dos resultados de um laboratório, devem fazer parte do currículo dos profissionais da área jurídica, em especial do Juiz. Muitas



vezes o exame técnico é muito bem realizado em um laboratório, mas o fundamento que interessa ao Juiz é a formulação correta do laudo. O Juiz deve suspeitar de laudos mal formulados ou transcritos, ou mesmo traduzidos de exames realizados no exterior, deve questionar também as metodologias empregadas, a correta documentação do caso, além de analisar alguns parâmetros técnicos do laboratório, por exemplo, o número de sondas VNTR ou o número de *loci* STR empregados para o exame, a metodologia empregada para os cálculos estatísticos, e por fim as qualificações técnicas do diretor clínico do laboratório.

Os exames em DNA, como se tratam de uma tecnologia recente no país, ainda carecem de muitos cuidados e de uma ampla normatização a fim de que resultados mais seguros possam ser corriqueiros do dia a dia. Não há números precisos sobre a quantidade de laudos de paternidade com resultados errados entre os mais de 10000 realizados todo o ano, mas segundo PENA (2000) cerca de 15% dos 2000 testes realizados em seu laboratório são exames realizados para corroborar ou desmentir um exame anterior, isto é são de contraprova. Infelizmente os indícios são de que os erros estão ocorrendo com uma espantosa frequência, fazendo com que ainda a confiabilidade destes exames dependa muito de onde se realiza o exame.

O advento da tecnologia para tipagem do DNA levanta duas questões-chave para a lei: determinar admissibilidade e explicar aos juristas os padrões adequados para pesar as evidências (COMMITTEE...1992).

28. Comentar sobre o poder de utilidade de uma prova em DNA em detrimento do seu custo?

A situação se parece com uma faca de dois gumes. Não há dúvida alguma sobre a fidedignidade e a resolução que estes exames oferecem, contudo, a onerosidade dos exames e o alto nível técnico requerido por parte dos profissionais para os testes em DNA, são sem dúvida alguma dois dos principais empecilhos pelos quais esses exames ainda não puderam ser empregados de uma forma mais ampla e universal nas mais diversas áreas da ciência.

Espera-se que com o tempo, os custos relativos a equipamento, materiais químicos e mão de obra para estes exames possam estar em um nível mais acessível e mais realista à sociedade brasileira.

Os avanços científicos em ácidos nucléicos permitiram colocar-se mais ordem em vários problemas sociais. Não há dúvidas que parâmetros de questionamentos existentes outrora em investigação de paternidade, como a má conduta notória da mãe do investigante, a exceção de múltiplo concubinato, a impossibilidade física por vasectomia e infertilidade masculina, e até a hematofobia do investigado estão caindo por terra, principalmente porque estas técnicas são potenciais na eliminação de quaisquer dúvidas, a partir de amostras biológicas diversas, evitando efetivamente os quadros de um inocente condenado ou de um culpado livre. Limitações na área criminal têm sido sanadas, como em casos de crime e estupro, onde relevante quantia de material biológico era empregada somente para se realizar provas de orientação e de certeza, isto é, saber se o material era de origem humana e a sua natureza, se era esperma, sangue ou saliva (DARUGE *et al.*, 1976; MONTANARO, 1995; SOARES-VIEIRA, 1998). Devido ao emprego destas novas técnicas, inclusive os hábitos dos criminosos têm tido mudanças



comportamentais. Pode-se dizer que as ciências forenses ganharam seu mais poderoso aliado nestes últimos anos, pois vários parâmetros puderam ser traçados a partir dos exames em DNA, como o estabelecimento de um padrão comparativo entre amostras, tanto em relação a vínculos genéticos, como para a identificação entre amostras de um mesmo indivíduo. Resumidamente, em genética forense as técnicas são específicas na comparação inter-indivíduos, intra-indivíduo e no estabelecimento de vínculos entre um indivíduo e um parente (LABER, 1995). Burocraticamente é imprescindível salientar que as técnicas em DNA forense tornaram os processos de identificação humana, mas principalmente os de investigação de paternidade muito mais simples, tanto para interpretação judicial como para a elaboração e a conclusão de um processo por parte dos peritos, pois ajudou a dirimir eventuais margens de dúvidas e questionamentos ora existentes, reprimindo a necessidade de memoriais nos autos, além de praticamente eliminar a presença de provas testemunhais duvidosas (FIG. 27).

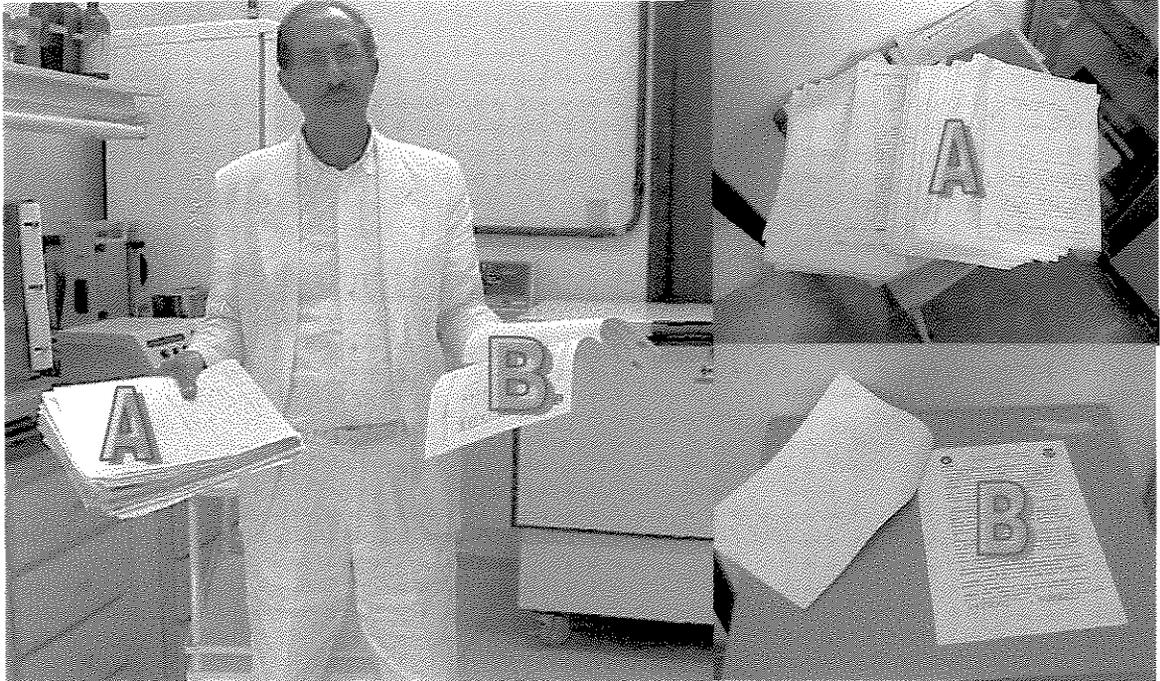


FIGURA 27 - Doutor Eduardo Daruge com um laudo de paternidade clássico(A) e um laudo de DNA(B)

Apesar de toda esta revolução científica e do aparato tecnológico trazido pelo progresso, não se deve superestimar, nem tampouco sacralizar, os valores destas provas, pois elas apresentam suas limitações técnicas, assim como qualquer outro exame identificatório (DRUMOND, 2000).

Assim, os testes a partir das técnicas em ácidos nucleicos são de extrema importância científica, mas também social. Exemplos nacionalmente conhecidos como a investigação de paternidade de celebridades como do ex-presidente Fernando Collor de Mello, Edson Arantes do Nascimento (Pelé), o cantor



Roberto Carlos, o jogador de futebol Edmundo envolvido com a modelo Cristina Mortágua; e outros de repercussão internacional como o caso amoroso envolvendo o ex-presidente americano Bill Clinton e sua secretária, a reconstituição identificatória da família de czares russos Romanov (IVANOV, 1994), o efêmero relacionamento amoroso que gerou uma petição de alimentos milionária contra o ex-tenista Boris Becker, o caso criminal envolvendo o ex-esportista americano O.J. Simpson e a identificação de famílias mortas na ditadura militar na Argentina, são exemplos claros da aplicabilidade e funcionalidade destes exames. Apesar de toda esta revolução científica e do aparato tecnológico trazido pelo progresso, não se deve superestimar, nem tampouco sacralizar, os valores destas provas, pois elas apresentam suas limitações técnicas, assim como qualquer outro exame identificatório (DRUMOND, 2000). Além do mais, para a sua efetividade, os testes em DNA, como qualquer outro, devem estar normatizados, regularizados por lei e serem realizados sob padrões rígidos de controle de qualidade. Assim, como tudo na vida, deve ter ordem.

Paradoxalmente à nossa bandeira, "a ordem não acompanha o progresso". Esta frase resume como se torna difícil a implantação, a regularização e a legalização de novas tecnologias, tendo em vista que a legislação nem de longe acompanha os progressos do dia a dia. Tal qual como costumava ocorrer na idade média, onde os avanços andavam a morosos passos, a lei continua no mesmo patamar de outrora, atuando como um freio de mão na exploração efetiva das potencialidades dos avanços científicos. Como um indivíduo com talassofobia em relação ao mar, assim é o receio da lei em relação ao progresso. A ausência de legislação específica para a admissibilidade e controle minuciosos dos testes de DNA, assim como da falta de parâmetros legais em relação aos arquivos eletrônicos e digitais, e a atuação dos códigos civis e penais, e das legislações profissionais durante todo o século passado e neste também, é um exemplo claro da apatia legislativa de nosso país. Infelizmente ainda andamos tropeçando em nossos próprios cadarços.

Deve-se ter em mente que as perícias médico-legais, tais como as análises forenses em materiais biológicos, são



subclassificações das provas judiciais propriamente ditas, aliás, caracterizam-se como uma ciência auxiliar ao judiciário, pois o caráter decisivo de uma questão ou sentença é emanado pelo tribunal, munido ou não de provas técnicas. Eventuais análises médico-legais ou biológicas podem ser requisitadas, podendo ou não influenciar uma dada sentença.

Apesar de todas as polêmicas que envolvem o sigilo das informações genéticas, seria difícil imaginar como que ter um enorme banco de dados com seqüências de ACTGs poderiam de alguma forma incorrer em preconceitos e discriminações futuras. Além disso, com o sequenciamento do genoma, algumas conclusões serviram para se colocar os objetos nos seus devidos lugares. É preciso salientar que o projeto genoma, e muito menos os exames identificatórios em DNA, não são o Santo Graal, nem a esperança de longas vidas como a de Matusalém e nem elixir de todos os mistérios da sociedade. O número determinado de genes foi 1/3 do número esperado, isto é Albert Einstein tinha apenas 1% mais gene que um rato e 50% mais que um verme (STIX, 2001). Diferenciar-nos biologicamente dos animais, ou mesmo de

outras pessoas, somente pelas informações genéticas, talvez seja até possível, mas tirarmos outras conclusões, como na área psicológica, racional ou de caráter de um ser, isto é totalmente inviável. Há muito mais do que alguns genes separando o abismo entre o homem e o macaco (FIG.27).

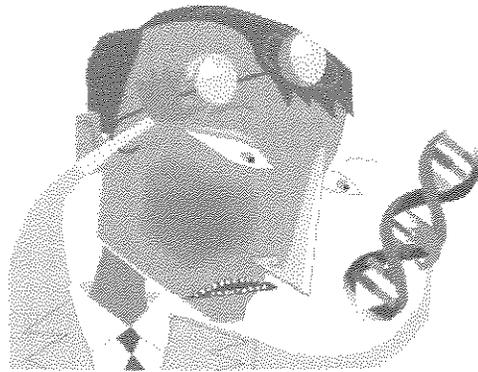


FIGURA 28 – O DNA e o HOMEM

Em poucas palavras o Dr. Steve Jones brilhantemente conclui o que a multicidência da genética significa para a sociedade:

“É notável o que a biologia pode fazer, em vista dos avanços de outros ramos da ciência. Mais notável ainda do que ter feito coisas impensáveis é imaginar que ela pode fazer coisas impossíveis. Existe ainda um grande potencial de crescimento nos campos de diagnóstico e prevenção, com implicações positivas na melhoria da saúde, mas perturbadoras no campo da privacidade e da ética.



Portanto, é normal que as pessoas se preocupem, pois a genética vai mudar nossa vida, talvez de forma indesejável. De fato o público tem sido enganado sobre o que a ciência pode ou não pode fazer. Mas, em outra parte, por uma confusão mais profunda, a genética está – ou parece estar – próxima de questões que atormentam a humanidade há muito tempo, mas que estão fora do âmbito da ciência. Questões de destino, família, identidade racial, de possibilidade de que alguns sejam maus ou bons de nascença, estão conosco desde muito antes de a ciência aparecer como tal, mas nenhuma envolve DNA. Em certo sentido, o Velho Testamento é o primeiro dos textos de genética, como demonstra a preocupação com a família, tribos e destino inato. Ao fim e ao cabo, o novo mundo dos genes talvez não seja tão diferente do mundo que conhecemos...” (JONES, 2000).

A partir do proposto neste trabalho, pode-se objetivamente concluir.que:

- Existe uma imensurável necessidade de se implantar, a nível governamental, uma adequada normatização, padronização e fiscalização dos serviços e das entidades que realizam exames de DNA forense;
- O Estado atualmente não dispõe de recursos humanos, técnicos e financeiros para atender à crescente demanda de exames de DNA para a justiça gratuita;
- Uma maior integralização e uma rigorosa adequação dos serviços policiais nas técnicas de coleta, armazenamento, documentação e tipagem das provas criminais são necessárias, a fim de se incrementar o índice de sucesso na solução de crimes e delitos;
- Deve ser estimulada a construção de um banco de dados de população nacional, mais abrangente e diversificado, para as frequências alélicas dos *loci* STR e VNTR mais usualmente empregados;
- A construção de um banco de dados de DNA para casos criminais, sejam de suspeitos ou de amostras de locais de crime, é altamente recomendável, desde que haja também uma adequação dos outros serviços de identificação, uma uniformidade dos serviços e procedimentos realizados nessa

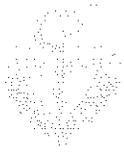


área, bem como uma integralização adequada entre estados e entre municípios;

- As autoridades policiais e judiciárias necessitam urgentemente estar mais bem orientadas e instruídas, a fim de tomarem decisões com mais destreza e fundamento, questionando inclusive eventuais falhas técnicas por parte dos peritos;
- Publicações de esclarecimento popular devem ser mais corretamente empregadas, evitando-se falsas expectativas, em especial as superestimadas;
- Uma ampla campanha de conscientização social deve ser implantada, tendo como alvo diminuir o número crescente de crianças geradas fora de uma sociedade conjugal estável;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, C.A.P. **Proposta de protocolo para identificação odonto-legal em desastres de massa.** Piracicaba, 2000. 153p. Tese (Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
2. ALVES, H.B. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de tecido ósseo para identificação humana "post mortem" através da análise de marcadores do DNA.** São Paulo, 2000. 56p. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas para exame geral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
3. ALVES-SILVA, J. *et al.* The ancestry in Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.67, n.3, p.444-461, Sept. 2000.
4. AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. **Parentage testing accreditation requirements manual.** 3a ed. Bethesda: National Academy Press. 1998, 101p.
5. BARBOSA, B. Quem é o pai? **Veja**, São Paulo, 19 jul. 2000, p.108-109, ano 33, n.29.
6. BEIGUELMAN, B. A lei de Hardy e Weinberg. *In:_____*. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. Cap.7, p.179-202.



7. **BÍBLIA DE REFERÊNCIA THOMPSON.** 12ª Ed. São Paulo. Ed Vida. 2000, 1743p.
8. BRENNER, C.H. A note on paternity computation in cases lacking a mother. **Transfusion**, Philadelphia, v.33, n.1, p.51-54, 1993.
9. BUCHALLA, A.N. Sexo: o melhor e o pior da vida a dois. **Rev Veja**, São Paulo, 21 mar. 2001, p.116-123, ano 34, n.11.
10. BUDOWLE, B., MORETTI, T.R. Genotype profiles for six population groups at the 13 CODIS short tandem repeat core Loci and other PCR-Base Loci. **Forensic Sci Communic**, Quantico, v.1, n.2, July 1999, p. <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july1999/budowle.htm>.
11. CAGLIA, A. *et al.* Increased forensic efficiency of a STR-based Y-specific haplotype by addition of the highly polymorphic DYS385 locus. **Int J Legal Med**, Heidelberg, v.111, n.3, p.142-146, 1998.
12. CAHALI, Y.S. **Dos alimentos.** 3ª ed. São Paulo: Revista dos Tribunais, 1999. 1175p.
13. CALABREZ, M.C.T., SALDANHA, P.H. A pesquisa de DNA em odontologia forense. *In:* SILVA, M. **Compêndio de odontologia legal.** São Paulo: Medsi, 1997. Cap.14, p.167-217.
14. COMMITTEE ON DNA TECHNOLOGY IN FORENSIC SCIENCE. **DNA technology in forensic science.** Washington: National Academy Press. 1992, 202p.

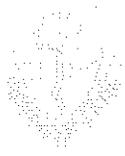
15. COSTA, L.R.S. **Estimativa do tempo de morte, através da análise do esfriamento corporal e sua importância pericial.** Piracicaba, 1998. 68p. Dissertação (Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
16. CROUSE, C.; SCHUMM, J.W. (1995) Investigation of species specificity using nine PCR-based human STR systems. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.40, n.3, p.952-956, May 1995.
17. DARUGE, E.; MASSINI, N.; GALDINO, A.M. **Ensaio sobre a sistematização sobre ensino de odontologia legal e deontologia.** Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas. 1976. 400p
18. DARUGE JÚNIOR, E. **Interação dos sistemas ABO, Lewis e fatores grupo-específico da saliva e sua importância pericial.** Piracicaba, 1998. 90p. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Odontologia Legal e Deontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
19. DECORTE, R. *et al.* Forensic medicine and the polymerase chain reaction technique. **J Med Genet**, London, v.30, p.625-633, 1993.
20. DELGADO, L.E.M. **Proposta de paternidade: uma proposta metodológica para seu cálculo.** São Paulo, 1998. 249p.



Tese (Doutorado em Estatística) – Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo.

21. DEVLIN, B., RISCH, N. Ethnic differentiation at VNTR loci, with special reference to forensic applications. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.51, n.3, p.534-548, Sept. 1992.
22. DIX, J.D., STOUT, S.D., MOSLEY, J. Bones, blood, pellets, glass, and no body. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.36, n.3, p.949-952, May 1991.
23. DRUMOND, J.G. A sacralização do DNA. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA LEGAL, 16., CONGRESSO BRASILEIRO DE ODONTOLOGIA LEGAL, 5., 2000, Recife. **Anais...** Recife : SBML-SOL, 2000.
24. EDWARD, J. Quem somos nós? **Veja**, São Paulo, dez. 2000, ano 33, n.51.
25. EVETT, I.W., WEIR, B.S. **Interpreting DNA evidence: statistical genetics for forensic Scientist.** Sunderland: Sinauer, 1998. 278p.
26. FARAH, S.B. **DNA : segredos e mistérios.** São Paulo: Sarvier, 1997. 276p.
27. **FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION.,**
<http://www.fbi.gov/programs/lab/fsc/current/dnaaudit.htm>
[último acesso em 02/2001]
28. FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética.** Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1995. 220p.

29. FUNG, W.K., HU, Y.Q. Interpreting DNA mixtures based on the NRC-II recommendation 4.1. **Forensic Sci Communic**, Quantico, v.2, n.4, Oct. 2000, p. <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/oct2000/fung.htm>.
30. GAGNEUX, P., BOESCH, C., WOODRUFF, D.S. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. **Mol Ecol**, Oxford, v.6, n.9, p.861-868, Sept. 1997.
31. GALVÃO, M.F. **Estimativa da idade pelos dentes através de sistema computadorizado integrado**. Piracicaba, 1999. 113p. Dissertação (Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
32. GONÇALVES, C.R. **Direito de família**. 7ª ed. São Paulo: Saraiva, 2000. 166p.
33. GONZALEZ, A. & SPOTORNO, K. Produtos que marcaram o século 20. **Zero Hora**, Porto Alegre, dez. 2000, p.28-19, ano 37, n.12911.
34. GRATTAPAGLIA, D.; BOLZON, A.; FERREIRA, M.E. Número adequado de locos analisados via PCR em exames de paternidade: vantagens em se utilizar baterias de 16 ou mais locos STR para proteção contra falsas inclusões e mutações. **Rev Laes & Haes**, nº 126, p.122-139, 2000.
35. GUROVITZ, H. Genética : o negócio da vida. **Exame**, São Paulo, maio 2000, p.40-58, ano 34, n.11.



36. GUYTON, A.C., HALL, J.E. Funções reprodutoras e hormonais masculinas. *In:* _____. **Tratado de fisiologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. Cap.80, p.911-922.
37. HANAOKA, Y., MINAGUCHI, K. D4S43 locus DNA typing in the Japanese population and application to teeth with degraded DNA. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.43, n.2, p.406-409, 1998.
38. HAUSMANN, R. **História da biologia molecular**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1997. 312p.
39. HENKE, L.; FIMMERS, R.; JOSEPH, E.; CLEEF, S.; DÜLMER, M.; HENKE, J. Usefulness of conventional blood groups, DNA minisatellites and short tandem repeat polymorphisms in paternity testing: a comparison. **Forensic Sci Int**, v.103(1), p.103-142, 1999.
40. HERRIN JR., G. Probability of matching RFLP patterns from unrelated individuals. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.52, n.3, p.491-497, Mar. 1993.
41. HERRMANN, B., HUMMEL S. **Ancient DNA** : recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. New York : Springer, 1994. p.263.
42. HOCHMEISTER, M.N. *et al.* PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. **Int J Legal Med**, Heidelberg, v.104, p.229-233, 1991.

43. HOFF-OLSEN, M.P. *et al.* Extraction of DNA from decomposed human tissue. **Forensic Sci Int**, Limerick, v.105, n.3 p.171-183, 1999.
44. HOLLAND, M.M. *et al.* Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.38, n.3, p.542-543, May 1993.
45. IVANOV, G.P. *et al.* Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. **Nat Genet**, New York, v.6, n.2, p.130-135, Feb. 1994.
46. JARRETA, M.B.M. **La prueba del ADN em medicina forense**. España : Masson, 1998. 341p.
47. JEFFREYS, A.J., BROOKFIELD, J.F.Y., SOMEONOFF, R. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. **Nature**, London, v.317, n.31, p.818-819, Oct. 1985a.
48. _____., WILSON, V., THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, London, v.314, p.67-73, Mar. 1985b.
49. JEFFREYS, A.J. *et al.* Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. **Forensic Sci Int**, Limerick, v.56, n.1, p.65-76, Sept. 1992.
50. JOBIM, L.F., JOBIM, M.R., BRENNER, C. Identificação humana pelo DNA. *In*: GALANTE FILHO, H. *et al.* **Identificação humana**. Porto Alegre : Sagra Luzzatto, 1999. p.239-303.



51. JONES, S. O que a genética não pode fazer. **Veja**, São Paulo, dez. 2000, p.140-146, ano 33, n.52.
52. KAYSER, M. *et al.* Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. **Int J Legal Med**, Heidelberg, v.110, n.3, p.125-133, 141-149, 1997.
53. LABER, T.L. *et al.* The evaluation and implementation of Match criteria for forensic analysis of DNA. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.40, n.6, p.1058-1064, 1995.
54. LANE, W.L. A Compreensão científica não anula a visão religiosa. **Ultimato**, Viçosa, v.32, n.261, p.26-33, nov./dez. 1999.
55. LEE, H.C. *et al.* DNA typing and forensic science. **Am J Forensic Med Pathol**, New York, v.15, n.4, p.269-282, 1994.
56. LEWIN, B. **Genes VII**. 7th ed. United Kingdom: Oxford Press, 2000. 990p.
57. LORENTE M. *et al.* Sequential multiplex amplification: utility in forensic casework with minimal amounts of DNA and partially degraded samples. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.42, n.5, p.923-925, Sept. 1997.
58. MARTINEZ, S.M. **Manipulação genética e direito penal**. São Paulo : IBCCrim, 1998. 300p.
59. McEWEN, J.E., REILLY, P.R. Review of state legislation on DNA forensic data banking. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.54, p.941-958, 1994.

60. MENCONI, D. Fábrica da vida. **IstoÉ**, São Paulo, fev. 2001, n.1638.
61. MIYAJIMA, F. *et al.* Considerações jurídicas do grau de acuracidade e veracidade dos exames de DNA. *In:* CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA LEGAL, 16., CONGRESSO BRASILEIRO DE ODONTOLOGIA LEGAL, 5., 2000, Recife. **Anais...** Recife : SBML-SOL, 2000.
62. MONTANARO, J.O. **Medicina legal para cursos e concursos.** São Paulo: Gramatrom, 1995. 135p.
63. MOUNT, S.M. Genomic sequence, splicing, and gene annotation. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.67, p.788-792, 2000.
64. MOURA-NETO, R. A investigação de crimes sexuais através do estudo do DNA. **Rev Panor Just**, Rio de Janeiro, v.10, p.44, fev./mar.1998.
65. _____. O INMETRO e as boas práticas de laboratório de DNA forense. *In:* CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA LEGAL, 16., CONGRESSO BRASILEIRO DE ODONTOLOGIA LEGAL, 5., 2000, Recife. **Anais...** Recife : SBML-SOL, 2000.
66. MOURA-NETO, R. & SILVA, R. DNA e suas aplicações forenses: considerações técnicas e estatísticas para marcadores genéticos. **Rev Newslab**, São Paulo, ed. 28, p.108-118, 1998.



67. MULLIS, K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci Am**. Apr. 1990, p.56-65.
68. MUYLLE, S., SIMOENS, P., LAUWENS, H. Ageing horses by an examination of their incisor teeth: an (im)possible task? **Vet Rec**, London, v.138, n.13, p.295-301, Mar. 1996.
69. NAVARRO. G.A. Genética Forense. *In*: GOMES, H. **Medicina Legal**. 32^a ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1997. Cap.35, p.809-846.
70. NEGRAO, T. **Código Civil e legislação em vigor**. 20^a ed. São Paulo: Saraiva, 2001. 1360p.
71. OLIVEIRA, R.N. **Freqüência alélica dos lócus DYS390, DYS391 e DYS393 em indivíduos brasileiros e sua aplicação à identificação humana**. Piracicaba, 2001. 139p. Tese (Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
72. OZAKI, A.N. **Determinação da frequência de genes de algumas regiões hipervariáveis do genoma humano para estudo do vínculo genético familiar em caucasianos brasileiros**. São Paulo, 1999. 93p. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

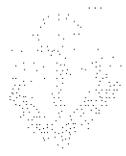
73. PALMIRATTA, R. *et al.* Origin and gender determination of dried blood on a statue of the Virgin Mary. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.43, n.2, p.431-434, Mar. 1998.
74. PENA, S.D.J. Pitfalls of paternity testing based solely on PCR analysis of minisatelites and microsatelites. **Am J Hum Genet**, V.56, p.1503-4. 1995.
75. PEREZ-LEZAUN, A. *et al.* Population genetics of Y-chromosome short tandem repeats in humans. **J Mol Evol**, New York, v.45, n.3, p.265-270, 1997.
76. PRIMORAC, D. *et al.* Identification of war victims from mass graves in Croatia, Bosnia, and Herzegovina by use of standard forensic methods and DNA typing. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.41, n.5, p.891-894, Sept. 1996.
77. PROMEGA CORPORATION. **Promega protocols and applications guide**. 3rd ed. Madison : Promega, 1996.
78. RAMALHO, S.A. **A importância pericial do estudo comparativo histomorfológico do osso humano e de outros gêneros**. Piracicaba, 2000. 199p. Tese (Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
79. RASKIN, S. **Investigação de paternidade** : manual prático do DNA. Curitiba: Juruá, 1998. 95p.
80. REIS, J.E.S. **Padronização da identificação humana por comparação radiológica computadorizada de**



estruturas ósseas. Piracicaba, 1999. 131p. Tese (Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

81. RUITBERG, C.M., REEDER, D.J., BUTLER, J.M. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.29, n.1, p.320-322, Jan. 2001.
82. SAIKI, R.K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v.239, n.29, p.487-491, Jan. 1988.
83. SAMBROOK, J., FRITSCHI, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.3, p.E1-E34.
84. SASAKI, M. *et al.* Human identification by genotyping of personal articles. **Forensic Sci Int**, Limerick, v.90, n.1/2, p.65-75, 1997.
85. SCHECK, B., CARDOZO, B.N. Invited editorial DNA data banking: a cautionary tale. **Am J Hum Genet**, Chicago, v.54, p.931-933, 1994.
86. SCHUTZBANK, T.E., STERN, H.J. Princípios e aplicação da reação da cadeia de polimerase. **Rev Bras Anal Clin**, Rio de Janeiro, v.25, n.4, p.112-118, 1993.

87. **SHORT TANDEM REPEAT DNA INTERNET DATABASE.**,
<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase> [último acesso em
02/2001]
88. SILVA, R., MOURA-NETO, R. Allelic frequency distribution for three VNTR markers – D6S132, D7S467, D17S26 – in Rio de Janeiro population, Brazil. **Forensic Sci Int**, Limerick, v. 94, n.1, p.33-38, 1998.
89. SILVA NETO, C.P. Clonagem: discussão ética e religiosa. **Rev Defesa Fé**, Jundiaí, v.3, n.20, p.16-24, mar. 2000.
90. SIMAS FILHO, F. **A prova na investigação de paternidade.** 7.ed. Curitiba: Juruá, 2000. 270p.
91. SIMÕES, A.L. Controle de qualidade de DNA forense pela SBML: estágio atual. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA LEGAL, 16., CONGRESSO BRASILEIRO DE ODONTOLOGIA LEGAL, 5., 2000, Recife. **Anais...** Recife : SBML-SOL, 2000.
92. SOARES-VIEIRA, J.A. **As Aplicações da biologia molecular na identificação humana em manchas e crostas de sangue.** São Paulo, 1998. 100p. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Medicina Legal) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
93. SOUZA, F.L. **Digitalização de radiografias odontológicas periapicais utilizando scanners e sua importância na odontologia legal.** Piracicaba, 2001. 143p. Tese (Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia) –



Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

94. STIX, G. Não, não é o Santo Graal Biológico. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, fev. 2001, p.A12, ano 122, n.39212.
95. THOMPSON, M.W., McINNES, R.R., WILLARD, H.F. **Genética médica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 339p.
96. THOMSON, J.A. *et al.* Validation of short tandem repeat analysis for the investigation of cases of disputed paternity. **Forensic Sci Int**, Limerick, v.100. p.1-16, Nov. 1998.
97. WHITTLE, M. Fontes de erro nos testes de paternidade. **Rev Newslab**, São Paulo, ed. 16, p.106-108, 1996.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. ADÃO e Eva. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 6 maio 2000, ano 80.
2. ANGELO, C. Diversidade entre índios já foi bem maior. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 27 set. 2000, p.A15.
3. BRASIL. **Código civil**. 37.ed. São Paulo: Saraiva, 1987.
4. _____. **Código penal**. 25.ed. São Paulo: Saraiva, 1987.
5. _____. Lei 8078, de 11 de setembro de 1990. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 12 set. 1990, suplemento ao nº 176.
6. CARVALHO, F. Ano 1953: DNA. **Rev Super Interessante**, São Paulo, dez. 1999, p.45.
7. CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA. **Código de ética odontológica**. São Paulo, 1992. 32p.
8. FERREIRA, A.B.H. **Mini Aurélio século XXI**. 4. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2000. 792p.
9. OHTANI, S., YAMAMOTO, K. Age estimation using the racemization of amino acid in human dentin. **J Forensic Sci**, Philadelphia, v.36, n.3, p.792-800, May 1991.
10. PÄÄBO, S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. **Nature**, London, v.314, n.18, p.644-645, Apr. 1985.



11. REUTERS, A. Grupo passa para a fase final do genoma. **Folha de São Paulo**, São Paulo, abr. 2000, p.13, ano 80, n.25937.
12. SEQÜÊNCIA do genoma chega à última etapa. **Folha de São Paulo**, São Paulo, abr. 2000, ano 80, n.25937.
13. TEICH, D.H. Genoma: o que ele tem a ver com sua vida. **Veja**, São Paulo, 5 jul. 2000, p.114-120, ano 33, n.27.
14. TEIXEIRA, D. Sua identidade genética. **Rev Super Interessante**, São Paulo, jul. 2000, p.80-83, ano 14, n.7.
15. WETTON, J.H. *et al.* Demographic study of a wild house sparrow population by DNA *fingerprinting*. **Nature**, London, v.327, n.14, p.147-152, May 1987.

Ácido desoxirribonucléico (DNA): uma classe das macromoléculas que consiste das duas cadeias longas de nucleotídeos. É a molécula que codifica a informação genética em todas as espécies, com exceção dos vírus de RNA, controla o funcionamento e a divisão celular e tem a capacidade de se autoduplicar passando de uma geração para a seguinte.

Ácido ribonucléico (RNA): molécula com estrutura semelhante ao DNA, geralmente apresentando uma cadeia simples de nucleotídeos, que contém o açúcar ribose ao invés da desoxirribose. Colabora na execução das informações genéticas codificadas no DNA ou, em raras espécies como os retrovírus, é a molécula que guarda a informação genética. Há três tipos de RNA: mensageiro, ribossômico e transportador.

Ácidos nucléicos: moléculas orgânicas complexas, formadas pela polimerização de nucleotídeos. Há dois tipos de ácidos nucléicos: DNA, RNA.

Aconselhamento genético: o processo de comunicação que oferece, aos indivíduos afetados e seus familiares, informações sobre uma doença com relação às suas conseqüências, formas de tratamento, probabilidades de desenvolvê-la e transmiti-la, permitindo que casais com alto risco tomem decisões conscientes sobre suas vidas reprodutivas.

Acrocêntrico: cromossomo no qual o centrômero está quase na ponta do cromossomo.

Adenina: uma das bases nitrogenadas, abreviada como **A**, presente nos nucleotídeos que se unem para formar o DNA e RNA. Parea com a timina(**T**) no DNA e com a uracila (**U**) no RNA.

Alelos: formas alternativas de um gene em um dado *locus*.

Aminoácido: a unidade química básica das proteínas; nos organismos vivos encontram-se vinte tipos de aminoácidos.

Amniocentese: procedimento utilizado no diagnóstico pré-natal, no qual o líquido amniótico (líquido que circunda o feto) é aspirado com auxílio de uma seringa e de um aparelho de ultra-som.

Amplificação: aumento do número de cópias de uma seqüência de DNA (ou gene), *in vivo*, pela sua inserção em um vetor que se duplica em uma célula hospedeira, ou *in vitro*, pela reação em cadeia de polimerase (PCR).

Anelamento: pareamento complementar de seqüência de DNA ou RNA, formando uma cadeia dupla de polinucleotídeos. O termo é freqüentemente usado para descrever a ligação de um *primer* ou uma sonda.



Ångström (Å): Unidade de medida correspondente a 10^{-10} , utilizada em homenagem ao físico sueco Anders Ångström, por ter demonstrado a existência de hidrogênio no sol, medindo seus comprimentos de onda em 10^{-10} m. A unidade Å é amplamente utilizada nas ciências exatas, apesar de não constar no SI (*Système International des Unités*).

Anticorpo: a proteína produzida pelo sistema imunológico em resposta à presença de uma substância estranha (antígeno) ou de um organismo invasor; cada anticorpo é específico para um antígeno, ao qual se liga para anular sua ação.

Antígeno: uma substância, normalmente uma proteína, que provoca a formação de um anticorpo quando introduzida em um organismo no qual não está usualmente presente.

ASO (*allele-specific oligonucleotides*): técnica de hibridização do DNA com oligonucleotídeos específicos, complementares ao gene mutante, ao gene normal, ou a um determinado sítio alvo.

Auto-radiografia: detecção da radioatividade por escurecimento da emulsão depositada em filmes de raio X.

Autossomos: qualquer cromossomo nuclear que não sejam os sexuais; na espécie humana há 22 pares de autossomos.

Banco de cDNA: uma coleção de fragmentos de DNA recombinantes que representa os genes que se expressam em um dado tecido de um organismo, como cópias do RNA mensageiro sintetizador.

Banco genômico: uma coleção de fragmentos de DNA recombinantes que representa o genoma completo de um organismo. Grande meta do Grupo Celera Genomics e Projeto Genoma Mundial.

Banda G: bandas claras e escuras visualizadas nos cromossomos, após o tratamento com tripsina e corante *Giemsa* e que permitem identificar cada par cromossômico, individualmente.

Base nitrogenada: uma molécula pequena que compõe o nucleotídeo e pode ser de quatro tipos no DNA: adenina, guanina, citosina, timina. O RNA possui os mesmo três primeiros tipos, mas a timina é substituída pela uracila.

Blotting: técnica bioquímica na qual macromoléculas (proteína, DNA ou RNA), separadas em géis de agarose ou poliacrilamida, são transferidas e imobilizadas em uma membrana de papel ou náilon para futuras análises.

Brometo de etídio: corante fluorescente que se intercala entre os nucleotídeos de DNA e RNA permitindo a observação dessas moléculas sob luz ultravioleta.

Cadeias polipeptídicas: uma molécula formada pela ligação linear de aminoácidos. Uma proteína pode conter uma ou mais cadeias polipeptídicas, cada uma codificada por um gene.

Cariótipo: a constituição cromossômica de um indivíduo ou a fotografia dos cromossomos tirada ao microscópio, nos quais os pares foram arranjados segundo uma classificação convencional.

Casamento consangüíneo: casamento entre indivíduos que pelo menos um ancestral comum.

Célula: a menor unidade dos organismos vivos. A célula animal é formada pela **membrana celular**, que isola seu conteúdo do meio ambiente, **citoplasma** no qual estão presentes várias organelas que desempenham diferentes funções, e **núcleo**, que contém o material genético, o DNA. Organismos inferiores, como as bactérias, são formados por uma única célula, a qual não apresenta um núcleo isolado. Organismos superiores apresentam um grande número de células, cada uma contendo um conjunto completo de genes.

Células germinativas: células reprodutivas que nos organismos com reprodução sexuada se unem para formar um novo organismo. Na espécie humana e em animais essas células são o ovócito, nas fêmeas, e o espermatozóide, nos machos.

Células somáticas: todas as células do corpo, com exceção das que se destinam a formar os gametas.

Células pluripotentes: células indiferenciadas, na maioria das vezes de origem embrionária, que guardam a capacidade de originar vários outros tipos de células especializadas.

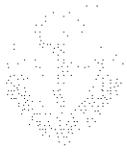
CentiMorgan (cM): unidade de distância genética. Dois *loci* estão distantes a 1cM quando a chance de recombinação entre eles na meiose é de 1%.

Centrômero: região do cromossomo que mantém as cromátides-irmãs unidas até a divisão celular.

Citogenética molecular: área de estudo da genética que agrega as técnicas moleculares às técnicas convencionais da citogenética a fim de aumentar o nível de resolução na observação dos cromossomos ao microscópio.

Citoplasma: a porção da célula que se estende da membrana celular até o núcleo e na qual ocorre a síntese das proteínas e grande parte das reações químicas.

Citosina: uma das bases nitrogenadas, abreviada como **C**, presente nos nucleotídeos que se unem para formar o DNA e o RNA. Parece com a guanina(**G**) tanto no DNA como no RNA.



Clonagem gênica: o termo é usado em engenharia genética para descrever a seqüência de eventos pela qual um fragmento de DNA (ou gene) é ligado a um vetor e duplicado em um grande número de cópias em uma célula hospedeira.

Clone: uma população de moléculas, células e organismos duplicados de um simples progenitor e, portanto idênticos.

Código genético: o código pelo qual a informação genética, contida na seqüência de nucleotídeos do DNA, relaciona-se com a seqüência de aminoácidos da proteína. Cada três bases do DNA (tríplice) especificam um dos vinte aminoácidos na proteína.

Co-dominante: a características (ou alelos) quando ambos os alelos de um par são expressos no heterozigoto.

Códon: uma seqüência de três bases de DNA ou RNA que codificam um aminoácido na proteína.

Cromátides-irmãs: as duas moléculas de DNA paralelas se unem pelo centrômero e formam um cromossomo, após a duplicação do DNA.

Cromossomos: formados por uma molécula de DNA muito longa empacotada com proteína; podem ser facilmente visualizados ao microscópio nas células em divisão. O número de cromossomos é característico de cada espécie e na espécie humana são 46.

Cromossomos homólogos: os dois elementos que formam um par de cromossomos, um de origem materna e o outro, paterna. Cromossomos homólogos têm os mesmos *loci* gênicos e na mesma ordem.

Cromossomos sexuais: responsáveis pela determinação sexual; na espécie humana são XX, na mulher, e XY, no homem.

Crossing-over (ou Permuta): a troca recíproca entre segmentos correspondentes de cromossomos homólogos, a qual ocorre na primeira divisão da meiose.

Deleção: perda de um segmento do material genético, cujo tamanho pode variar de um simples par de bases no DNA a porções cromossômica ou até mesmo um cromossomo todo.

Desnaturação do DNA: o processo de separação das fitas complementares de DNA ou RNA, que rompe as pontes de hidrogênio através de temperaturas elevadas ou do tratamento com solução alcalina.

Desoxirribose: molécula de açúcar, composta por cinco carbonos, que compõe os nucleotídeos do DNA.

Diagnóstico pré-natal: diagnóstico de uma doença antes do nascimento.

Diferenciação celular: processo pelo qual a célula adquire funções mais especializadas.

Dipeptídeo: dois aminoácidos unidos por ligação peptídica.

Diplóide: simbolizado por $2n$, refere-se ao número cromossômico quando dois conjuntos completos de cromossomos estão presentes (pares de cromossomos). A maioria das células somática é diplóide e na espécie humana o número $2n$ é igual a 46.

DNA fingerprintsing: o padrão único de fragmentos de DNA observado para cada indivíduo, que se assemelha ao código de barras usado no comércio e que reflete a variação de regiões altamente polimórficas ou hipervariáveis do genoma.

DNA extragênico: seqüências de DNA que não transcrevem e encontram-se espalhadas no genoma entre os genes.

DNA microssatélite: DNA que contém múltiplas repetições e *tandem* de uma unidade representada por uma seqüência de 1 a 4pb.

DNA mitocondrial(mtDNA): o DNA do cromossomo circular presente nas mitocôndrias.

DNA repetido: consiste de seqüências de DNA presentes em múltiplas cópias no genoma.

DNA satélite: DNA que contém múltiplas repetições em *tandem* de uma unidade representada por uma seqüência relativamente grande (da ordem das centenas de pb).

Diplóide: aquilo que contém dois conjuntos de cromossomos homólogos e, portanto, duas cópias de cada gene ou *locus* genético.

Dupla hélice: estrutura da fita dupla na molécula do DNA, com cada uma delas enrolada sobre a outra.

Eletroforese: técnica na qual macromoléculas são separadas em uma matriz (solução coloidal, gel) sob a influência de um campo elétrico. A migração é sempre no sentido do pólo catódico (negativo) para o anódico (positivo) e a velocidade é dependente do tipo de gel (agarose ou acrilamida) e da intensidade da corrente elétrica

Endonuclease: (veja enzima de restrição)

Engenharia genética: a tecnologia na qual os genes podem ser isolados, transferidos para outras células ou organismos, duplicados e ativados; permite a manipulação do material genético de um organismo, introduzindo ou eliminando genes específicos.

Enzima: uma molécula de proteína que promove e acelera uma determinada reação biológica, sem ser alterada ou destruída.

Enzima de restrição: derivada de bactérias, reconhece uma seqüência específica de bases no genoma e corta a molécula de DNA no sítio de reconhecimento ou próximo dele.

Eritrocitários: referente aos eritrócitos ou hemácias, que são células anucleadas correspondentes aos glóbulos vermelhos do sangue.



Eucariotos: organismos cujas células apresentam núcleo bem caracterizado, separado do citoplasma pela membrana nuclear, organelas especializadas e divisão mitótica.

Eugenia: estratégia que tenta melhorar as qualidades humanas hereditárias por, meio de casamentos seletivos, ou manipulando artificialmente a transmissão de características dito desejáveis e inibindo a transmissão daquelas indesejáveis.

Exons: a porção do gene presente no RNA mensageiro maduro, correspondente a uma região que codifica proteína, em contraste com o íntron que é removido durante o amadurecimento do RNA. Um único gene pode ter vários exons.

Expressão gênica: representa a manifestação ou a ativação funcional de um gene, através de síntese protéica.

Família de multigenes: um conjunto de genes com estrutura muito semelhante presentes no genoma. Não se sabe ao certo as suas verdadeiras funções.

Fenótipo: o caráter observável de uma célula ou organismo ao nível bioquímico, fisiológico ou morfológico, determinada pela interação de sua constituição genética com fatores ambientais.

Fingerprints: (veja DNA fingerprints).

Frequência alélica: A proporção de um alelo particular carregado por alguns indivíduos em uma dada população.

Gametas: são as células reprodutivas, óvulo ou espermatozóide, que possuem um número haplóide de cromossomos, isto é metade de um conjunto diplóide.

Gene: uma porção de DNA que contém em sua seqüência de bases a informação genética específica para a síntese de uma cadeia polipeptídica.

Genes ligados: genes que estão próximos num mesmo cromossomo e têm a tendência de ser transmitidos juntos após a meiose.

Genes sintênicos: genes presentes em um mesmo cromossomo, quer apresentem ou não a tendência de serem transmitidos juntos após a meiose.

Genética clássica: estudo genético que não emprega técnicas moleculares.

Genoma: o conjunto completo de cromossomoshaplóides que contém toda a informação genética de um indivíduo.

Genótipo: a constituição genética de um indivíduo, ou mais especificamente, os alelos presentes em um *locus* gênico.

Grupo fosfato: uma molécula que compões os nucleotídeos do DNA e do RNA.

Guanina: uma das bases nitrogenadas, abreviada como G, presente nos nucleotídeos que se unem para formar o DNA e o RNA, pareando-se com a citosina tanto no DNA como no RNA.

Haplóide: simbolizado como n , que é 23 no homem, refere-se ao número cromossômico quando está presente um único conjunto cromossômico, metade do número diplóide ($2n$).

Hemizigose: refere-se aos genes ligados ao cromossomo X em indivíduos do sexo masculino, por estes apresentarem apenas um único cromossomo X.

Heterocromatina: a cromatina que cora fortemente após o tratamento com tripsina e corante Giemsa; é composta por seqüências repetitivas de DNA e, na grande maioria, inativa do ponto de vista genético.

Heterozigoto: indivíduo (ou genótipo) com dois alelos diferentes em um dado *locus* de cromossomos homólogos.

Hibridização: é a ligação de fitas simples de DNA/DNA ou DNA/RNA, por complementariedade de suas bases nitrogenadas, para formar uma cadeia de fita dupla.

Hibridização *in situ*: método de mapeamento de um gene pela hibridização molecular de sonda diretamente com os cromossomos, após desnaturação do DNA.

Homozigoto: indivíduo (ou genótipo) com um par de alelos iguais em um dado *locus* de cromossomos homólogos.

Inserção (cromossômica): alteração cromossômica na qual um segmento de DNA de um cromossomo está inserido em um cromossomo não-homólogo.

Íntrons: a porção do gene que está ausente no RNA mensageiro maduro e não apresenta representada no cromossomo.

Ligação peptídica: a ligação química que ocorre entre dois aminoácidos para a formação de um polipeptídeo. O grupo carboxila de um aminoácido reage com o grupo amino de outro aminoácido, ocorrendo a eliminação de uma molécula de água.

Ligado ao X: refere-se a características ou genes presentes no cromossomo X.

Locus (plural loci): uma precisa localização em um cromossomo, a qual pode ser ocupada por um gene ou por uma seqüência de DNA não codificadora.

Macromoléculas: classe de polímeros que compreende os ácidos nucleicos (DNA e RNA) e as proteínas.

Mapeamento: a determinação da localização física de um gene ou marcador genético em um cromossomo.

Marcador genético: *locus* cujos alelos são facilmente detectáveis, utilizado em estudos genéticos. Pode ser um gene, um sítio de restrição ou qualquer outra característica do DNA que permita distinguir as diferentes versões naquele *locus*.



Meiose: um tipo especial de divisão celular que consiste de duas divisões sucessivas do núcleo com uma única duplicação cromossômica, resultando em quatro células-filhas e na redução do número diplóide para haplóide. Ocorre na produção dos gametas.

Metacêntrico: Cromossomo cujo centrômero está no meio do cromossomo.

Mitocôndria: organela citoplasmática que produz energia química utilizada pela célula para realizar suas células.

Mitose: o processo de divisão celular que origina duas células-filhas geneticamente idênticas à célula parental. Ocorre nas células somáticas para o crescimento do organismo.

Molécula: grupo de átomos que juntos formam uma substância estável.

Monogênica (mendeliana): característica controlada por um simples par de alelos transmitidos segundo as leis de Mendel.

Monômero: a unidade que se repete em uma molécula longa, o polímero.

Mutação: mudança brusca na informação genética; normalmente refere-se à alteração de um simples par de base no DNA, mas o termo também inclui alterações maiores, visíveis ao microscópio, como as aberrações cromossômicas.

Mutação de ponto: mutação que envolve somente um par de bases.

Núcleo: o centro de controle da célula onde o DNA reside, nos eucariotos permanece separado do citoplasma pela membrana nuclear.

Nucleotídeo: a unidade das moléculas de ácidos nucléicos (DNA e RNA), compostas de uma molécula de açúcar, um grupo fosfato e uma base nitrogenada.

Oligonucleotídeo: um fragmento sintético de DNA composto de somente alguns poucos nucleotídeos (normalmente de 8 a 50).

Organismos multicelulares: seres vivos formados por inúmeras células que cooperam entre si e apresentam diferentes especialidades, contribuindo para a sobrevivência do indivíduo.

Organismos unicelulares: seres vivos formados por uma única célula capaz de sobreviver, reproduzir-se e, algumas vezes, cruzar-se, por exemplo, bactérias.

Par de bases (pb): unidade de medida do comprimento de seqüências de DNA dupla fita; molecularmente corresponde a um par de bases complementares ligados entre si, cada qual na sua cadeia simples.

PCR (polymerase chain reaction): técnica de amplificação enzimática de um pequeno segmento de DNA ou RNA.

Penetrância: um conceito de tudo ou nada que se refere à expressão de um gene mutante para uma característica autossômica dominante. Quando não dominância de

um gene dominante, apesar dele estar presente, dizemos que houve não-penetrância do gene.

Permuta: veja *crossing-over*

Poliacrilamida: Gel muito utilizado nos processos de eletroforese.

Polímero: molécula muito longa composta de um grande número de subunidades pequenas que se repetem, os monômeros.

Polimerase do DNA: enzima que sintetiza o DNA de fita dupla usando um *primer* de iniciação e um DNA como fita molde.

Polimorfismo: a ocorrência em uma população de dois ou mais genótipos alternativos, quando a frequência de cada um deles é superior àquela que poderia ser mantida somente por mutações recorrentes, na prática, um locus é considerado polimórfico quando a frequência do genótipo mais raro é de no mínimo 1%.

Pontes de hidrogênio: em uma ponte de hidrogênio, o átomo de hidrogênio está ligado a outros dois átomos, que em sistemas biológicos podem ser nitrogênio ou oxigênio. As pontes de hidrogênio mantêm as duas fitas de DNA unidas na dupla hélice e estabilizam a estrutura das proteínas.

Primer: um pequeno segmento de DNA ou RNA que, anelado à fita simples de DNA, permite que a enzima polimerase do DNA sintetize a segunda fita do DNA formando a dupla hélice.

Procariotos: organismos cujo material genético não está contido dentro de um núcleo bem definido por membrana nuclear. Inclui vírus, bactérias e algumas algas.

Projeto Genoma Humano: Projeto desenvolvido em colaboração internacional que tem como objetivos mapear e seqüenciar todos os genes presentes nos mais de 3 bilhões de pares de bases do genoma humano, além de organizá-los.

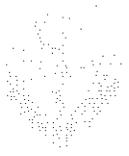
Proteínas: moléculas formadas por uma ou mais cadeias lineares de aminoácidos (cadeia polipeptídica). Realizam a maior parte das tarefas dentro das células e inclui enzimas, hormônios, anticorpos, moléculas receptoras e estruturais.

Pseudogene: seqüência de DNA muito semelhante a um gene que se expressa, mas que pode ter-se tornado inativa pelo acúmulo de mutações no decorrer de gerações.

Quimera: indivíduo composto por duas linhagens celulares derivadas de zigotos independentes. Em humanos, quimeras costumam ocorrer após transplantes homogêneos de medula óssea.

Rearranjo (cromossômico): alteração cromossômica devido à transferência de um segmento de um cromossomo para outro.

Recessiva: Uma característica (ou alelo) que deve estar presente em forma dupla (homozigose) para ser expressa no fenótipo.



Recombinação homóloga: troca de fragmento de DNA entre duas moléculas de DNA ou cromossomos pareados durante a divisão celular, envolvendo seqüências de nucleotídeos idênticas ou muito semelhantes.

Região D-loop: região do DNA mitocondrial com aproximadamente 1.000pb muito variável de um indivíduo para outro.

Renaturação (do DNA): quando duas fitas complementares de DNA voltam a unir-se, por meio de pontes de hidrogênio, para formar a dupla hélice.

RFPL (*restriction fragment length polymorphism*): polimorfismo do DNA resultante de uma mutação que cria ou destrói um sítio de restrição.

Ribose: molécula de açúcar que compõe os nucleotídeos do RNA.

Ribossomo: pequenas partículas presentes no citoplasma das células onde o RNA mensageiro se prende para que sua mensagem seja traduzida em uma particular seqüência de aminoácidos. Estruturas fundamentais para a síntese de proteínas.

RNA: (veja ácido ribonucléico).

RNA mensageiro (RNAm): classe de RNA que copia a mensagem de um gene de DNA e se dirige para os ribossomos no citoplasma onde a informação é utilizada para sintetizar uma proteína.

Seqüenciamento: método para determinar uma seqüência de nucleotídeos em um fragmento de DNA.

Seqüência simples: seqüência de DNA, única no genoma ou que aparece poucas vezes representada.

Síntese de proteínas: o processo pelo qual os aminoácidos se ligam para formar uma proteína.

Sistema de reparo do DNA: o conjunto de enzimas que desempenham as funções de reconhecer uma mutação no DNA e consertar (reparar) o erro.

Sítio de restrição: uma pequena seqüência de bases no DNA que pode ser reconhecida e cortada por uma enzima de restrição específica.

Sonda: uma fita simples de DNA ou RNA que tenha sido marcada (quimicamente ou radioativamente) e é usada para identificar genes ou fragmentos de DNA de interesse, por meio da complementariedade da seqüência de bases.

Southern blotting: técnica de transferência de fragmentos de DNA, que tenham sido separados por eletroforese, para uma membrana de nitrocelulose ou náilon.

Submetacêntrico: cromossomo no qual o centrômero estar distante do centro do cromossomo.

Substrato: a substância alvo da ação de uma enzima.

STS (*sequence-tagged site*) uma seqüência única de DNA usada como ponto de referência (marcador) no cromossomo.

Tandem: uma seqüência de DNA se repete em tandem quando as cópias estão em seguida, uma após a outra, em um dado ponto do genoma.

Tecido: conjunto de células que desempenham as mesmas funções.

Telômero: a região final do cromossomo.

Terapia gênica: o reparo ou substituição de um gene defeituoso visando ao tratamento e à cura de uma doença.

Timina: uma das bases nitrogenadas, abreviada como **T**, presente nos nucleotídeos que se unem para formar o DNA e pareia com a adenina.

Tradução: processo pelo qual a mensagem codificada no mRNA é lida, resultando na formação da cadeia de polipeptídios correspondentes.

Transcrição: processo pelo qual a dupla hélice de DNA se desenrola e uma cópia de RNA é sintetizada a partir de uma das fitas complementares de um gene.

Transcriptase reversa: uma enzima isolada de células infectadas pelo retrovírus, que sintetiza um DNA complementar (cDNA) a partir de uma fita molde de RNA.

Tranferência gênica: quando um gene é isolado de certas células e introduzido em outras, de espécie idêntica ou de espécie diferente.

Transgene: o gene exógeno presente em organismos transgênicos.

Transgênico: termo usado para designar um organismo que carrega um gene exógeno incorporado de forma estável em seu genoma, tanto nas células somáticas como germinativas, o qual se expressa em um ou mais tecidos, e é transmitido para as gerações futuras segundo as leis de Mendel.

Uracila: uma das bases nitrogenadas, abreviada com **U**, presente nos nucleotídeos que se unem para formar o RNA e pareia com a adenina.

VNTR (*variable number of tandem repeats*): um tipo de polimorfismo do DNA criado por pequenas seqüências de DNA repetidas em *tandem* e hipervariáveis, utilizado em estudos de ligação e em DNA *fingerprinting* para testes de paternidade e identificação dos indivíduos.