

PRINCÍPIOS DE GENÉTICA FORENSE

FRANCISCO CORTE-REAL
DUARTE NUNO VIEIRA



Capítulo 2

CRIMINALÍSTICA BIOLÓGICA

M. Fátima Pinheiro

Professora Afiliada do ICBAS, Universidade do Porto

Professora Afiliada da Faculdade de Medicina, Universidade do Porto

Membro do CENCIFOR (Centro de Ciências Forenses)

DOI | [HTTP://DX.DOI.ORG/10.14195/978-989-26-0957-7_2](http://dx.doi.org/10.14195/978-989-26-0957-7_2)

RESUMO

São abordados os objetivos das perícias de Genética Forense na perspectiva da identificação genética de amostras biológicas (problema e de referência) colhidas no âmbito das perícias de criminalística biológica, bem como os capítulos e as particularidades a mencionar no respectivo relatório pericial. Para além da referência aos marcadores genéticos mais usados na atualidade, para a resolução deste tipo de perícias, são indicados os principais tipos de crimes relacionados com os quais são solicitadas as referidas perícias. Acresce as respetivas amostras biológicas colhidas nos diferentes delitos (sangue, sémen, saliva, pelos e células epiteliais). Por fim, são enumeradas as conclusões possíveis do relatório pericial, assim como a respetiva valorização da prova, quando se verifique a concordância de perfis genéticos da(s) amostra(s) problema com a amostra de referência.

PALAVRAS-CHAVE

Criminalística biológica; amostras biológicas; relatório pericial.

SUMMARY

The objectives of the exam of Forensic Genetics are addressed from the perspective of genetic identification of biological samples (problem and reference) collected within the expertise of biologic criminalistics, as well as chapters and particularities to mention at the appropriate expert report. Apart from the reference to the genetic markers most used today, to solve this kind of expertise, are listed the main types of related crimes with which these exams are required, and the respective biological samples taken at different crimes (blood, semen, saliva, hair and skin cells). Finally, the possible conclusions of the expert report are listed, as well as the respective weighing of the evidence, if there is agreement from genetic profiles of unknown sample(s) with the reference sample.

KEYWORDS

Biologic criminalistics; biological samples; expert report.

1. INTRODUÇÃO

A identificação genética em material biológico relacionado com perícias do âmbito da investigação de parentesco, criminalística biológica e identificação individual (em especial de restos cadavéricos), com a utilização de marcadores genéticos, também chamados polimorfismos de DNA (Ácido Desoxirribonucleico), tem sido ao longo dos tempos o principal objetivo da Genética Forense. Na atualidade, o recurso às mais eficazes e inovadoras metodologias e tecnologias possibilita o estabelecimento de conclusões, no contexto de relatórios periciais, inimagináveis há ainda escassas décadas. No presente, para além dos meios usados no quotidiano laboratorial, existe uma panóplia de soluções inovadoras que, num futuro próximo, poderão propiciar a obtenção de resultados conducentes à cabal e rápida identificação genética individual. Esta circunstância terá uma utilidade irrefutável em vários contextos, designadamente na investigação criminal (Pinheiro, 2009).

Em relação aos três tipos de perícias mencionadas, são colhidas amostras biológicas e/ou é recebido material biológico de natureza diversa, sendo efetuada a interpretação e valorização estatística dos resultados, após o percurso laboratorial apropriado para cada caso. As conclusões da perícia constam no relatório pericial, enviado à entidade requisitante, que irá constituir prova em tribunal (Pinheiro, 2009).

Criminalística, de acordo com Villanueva Cañadas, é a ciência que estuda os indícios deixados no local do delito, graças aos quais é possível estabelecer, nos casos mais favoráveis, a identidade do criminoso e as circunstâncias que concorreram para o referido delito. O seu

interesse reside no facto de se procurar vestígios anatómicos, biológicos ou humorais que permitam estabelecer a identidade do autor do crime, sendo que a criminalística biológica se ocupa dos de natureza estritamente biológica.

Estas amostras ou vestígios biológicos são colhidos, em geral, no local do crime, corpo ou peças de vestuário da vítima ou do suspeito. A identificação genética destas amostras é feita através do estudo do DNA. Para se realizar este estudo é necessário qualquer tipo de mancha ou produto que contenha material genético. Este material genético encontra-se em todas as células nucleadas do organismo humano e possui características importantes para a identificação genética, já que o DNA nuclear (DNA_n) dos autossomas (cromossomas não sexuais), estudado no âmbito da Genética Forense, é único para cada indivíduo (excetuando os gémeos monozigóticos), sendo idêntico em todas as suas células; ou seja, estudando qualquer vestígio biológico pode-se identificar o indivíduo ao qual esse vestígio pertence.

Deste modo, a perícia de Genética Forense realizada em amostras biológicas de natureza diversa (sangue, sêmen, pelos, saliva, células epiteliais), colhidas em distintos suportes (corpo da vítima ou do suspeito, peças de vestuário, roupa de cama, entre outros), no contexto da investigação da prática de um crime, consiste no seu estudo laboratorial, a fim de se estabelecer o perfil genético. A análise dos resultados incide sobre a comparação do perfil genético das amostras biológicas relacionadas com o delito (amostras problema) com os perfis genéticos da vítima e do suspeito (amostras de referência). A existência de concordância entre o perfil genético da amostra biológica relacionada com o

delito e o perfil genético do suspeito é fortemente indicativa de que este foi o seu dador. Neste caso, faz-se a valorização dos resultados através da determinação do Likelihood Ratio (LR).

No relatório pericial deve constar, entre outras particularidades do caso em estudo, informação relativa à entidade requisitante, referência ao material enviado para exame, descrição pormenorizada desse material, metodologias usadas e respetivas referências bibliográficas, resultados e conclusões, nas quais pode ser incluído o LR.

Serão efetuadas referências ao Serviço de Genética e Biologia Forense da Delegação do Norte, do Instituto Nacional de Medicina Legal, IP, identificado no texto por SGBF, DN.

2. POLIMORFISMOS DE DNA (MARCADORES GENÉTICOS) MAIS USADOS

Nas células nucleadas humanas existem dois tipos de DNA, o DNA nuclear (DNA_{nu}) e o DNA mitocondrial (DNA_{mt}).

O DNA do núcleo das células está organizado em cromossomas, apresentando-se altamente compactado e protegido por proteínas denominadas histonas. Uma única cópia do genoma humano é constituída por cerca de 3.200 milhões de pb (pares de bases), sendo que cada célula somática possui 22 pares de autossomas e dois cromossomas sexuais (X,Y no homem e X,X na mulher). Assim, cada célula somática humana normal possui 46 cromossomas (23 pares de cromossomas), sendo, por isso, designada de diplóide. As células germinais ou gâmetas (ovócitos e espermatozoides) encontram-se na forma

haplóide, por possuírem apenas um conjunto de 23 cromossomas. Aquando da fecundação o zigoto, derivado da junção dos dois gâmetas, resulta diplóide (Pinheiro, 2010b).

A resolução dos casos forenses consta da identificação genética das amostras biológicas com eles relacionadas e baseia-se na caracterização de polimorfismos do DNA, também chamados de marcadores genéticos, das regiões não codificantes do genoma humano. Atualmente, para a conclusão das perícias forenses usa-se preferencialmente o DNA_{nu}, podendo em circunstâncias especiais utilizar-se o DNA mitocondrial (DNA_{mt}). Para além das suas diferenças de tamanho e estruturais, apresentam distintas formas de herança, pois, o DNA_{nu} é herdado de ambos os progenitores, à exceção do cromossoma Y, sendo o DNA_{mt} de herança uniparental materna (Pinheiro, 2010b).

Aproximadamente 3% do genoma humano é constituído por repetições em *tandem*. Trata-se de sequências de DNA não codificante que se repetem sucessivamente, cuja diferenciação entre indivíduos da mesma espécie reside no número de repetições que cada indivíduo apresenta para um determinado *locus* de um par de cromossomas homólogos. A herança do número de repetições obedece às Leis da Hereditariedade estabelecidas por Mendel, tal como a de qualquer outro polimorfismo usado com fins forenses. Assim, este DNA repetitivo, excetuando o DNA satélite que se encontra nas proximidades dos centrómeros dos cromossomas, é classificado em dois grupos, minissatélite e microsatélite, de acordo com o tamanho da sequência de repetição (unidade de repetição) (Pinheiro, 2010b).

São, fundamentalmente, as regiões microsatélite do genoma que constituem a base da

identificação genética. Trata-se de marcadores genéticos, designados de STRs (*Short Tandem Repeats*), que consistem em sequências de DNA de 2-7 pb, dispersas pelo genoma, que se repetem em *tandem*, cujo tamanho dos alelos é inferior a 350 pb.

A importância da análise destas sequências de DNA não codificante, em perícias de Genética Forense, prende-se com o facto de não estarem relacionadas com a síntese de proteínas e, por isso, não haver qualquer correlação que permita deduzir a predisposição do dador da amostra biológica para manifestar uma determinada patologia.

O número de repetições para cada polimorfismo pode variar de indivíduo para indivíduo. Esta característica permite diferenciar indivíduos de uma determinada população, mesmo irmãos germanos (filhos do mesmo pai e da mesma mãe) e até gémeos dizigóticos, porque os monozigóticos possuem para estes marcadores informação genética idêntica, salvo raras exceções (existência de mutações). Evidencia-se que as sequências de DNA codificante, que possuem informação genética para a produção de proteínas, são praticamente idênticas para todos os indivíduos, razão pela qual estas regiões do genoma não são as indicadas para distinguir indivíduos de uma população, não sendo, por isso, as eleitas em Genética Forense. Esta prerrogativa desmistifica o argumento, por vezes apresentado, de que se pode inferir, a partir da análise de amostras biológicas, a predisposição de um determinado indivíduo para contrair uma certa doença, circunstância que podia ser aproveitada por empregadores para rejeitar contratos ou por seguradoras para onerar a prestação de um seguro, entre outras consequências.

Não obstante existirem STRs com o tamanho da unidade de repetição variável (2-7 pb), os mais usados em Genética Forense são os tri, tetra e pentanucleotídicos, sendo os tetranucleotídicos (unidade de repetição com 4 nucleótidos, por ex. GATA) os mais utilizados. Calcula-se que o genoma humano contenha, aproximadamente, 500.000 STRs, dos quais 6.000 a 10.000 são tri ou tetraméricos.

As principais vantagens dos STRs prendem-se, fundamentalmente, com o facto de possuírem alelos de tamanhos próximos, o que possibilita a realização da sua análise em simultâneo (multiplex) e a capacidade de gerarem produtos de amplificação de pequeno tamanho, o que é benéfico, tendo em consideração a análise de DNA de amostras degradadas.

O percurso laboratorial das amostras problema no contexto da criminalística biológica inclui, habitualmente, os seguintes passos: a) observação do material recebido; b) descrição do material recebido; c) testes preliminares para determinação da natureza da amostra biológica (sangue, sémen, saliva); d) extração do DNA; e) quantificação do DNA (Real-Time qPCR); f) amplificação do DNA por PCR (em termocicladores); g) análise dos produtos amplificados (em sequenciadores automáticos); h) análise dos resultados obtidos (comparação do perfil genético da(s) amostra(s) problema(s) com o(s) da(s) amostra(s) de referência(s)); i) valorização estatística dos resultados (por vezes não incluída no relatório pericial); j) elaboração do relatório pericial.

A(s) amostra(s) de referência segue(m) o mesmo percurso laboratorial, à exceção dos 3 primeiros passos.

2.1. STRS AUTOSSÓMICOS

2.1.1. Considerações gerais

O estudo de STRs autossômicos é realizado na resolução de todo o tipo de perícias de Genética Forense, recorrendo-se à análise de outros grupos de polimorfismos do DNA quando se pretende obter informação adicional, ou quando o material genético se encontra em quantidade exígua e/ou degradado, e não é possível a obtenção de resultados. Esta circunstância deve-se ao facto dos marcadores autossômicos sofrerem recombinação genética (processo através do qual a descendência produz uma combinação de genes diferente dos seus progenitores). Por isso, apresentam uma grande variabilidade, o que proporciona um maior poder de informação. Os STRs do cromossoma Y e o DNA mitocondrial, por serem haplóides, não sofrem recombinação, exibindo, por isso, uma variabilidade genética inferior.

Para a tipagem de STRs autossômicos são usados, em geral, kits que possibilitam a análise simultânea de 15 *loci* STR (sistemas multiplex) e a Amelogenina. Os que têm sido mais utilizados são o AmpFISTR® Identifiler™ (Applied Biosystems) e o Powerplex®16 (Promega). Em casos complexos, em que é manifesta a necessidade de incrementar o poder informativo, têm sido usados outros kits para a caracterização de marcadores genéticos adicionais.

Em estudo realizado em amostras provenientes de indivíduos não relacionados do Norte de Portugal, foram determinadas as frequências dos alelos, bem como os parâmetros de interesse forense, com o AmpFISTR® Identifiler™ (Pinheiro e col., 2005).

Estas duas empresas fizeram, recentemente, grandes investimentos na produção de kits para a caracterização destes marcadores genéticos, tendo em consideração três aspetos fundamentais: a) introdução de novos polimorfismos que proporcionem um maior poder de informação (poder de discriminação); b) caracterização de polimorfismos de pequeno tamanho (miniSTRs), que permitam a obtenção de resultados em amostras degradadas e/ou com quantidades diminutas de material genético; c) alteração da sua química para obviar o passo de extração do DNA no percurso laboratorial, o que torna mais rápida a análise de amostras biológicas.

Estas modificações têm tido um grande impacto no desempenho laboratorial, em particular as duas primeiras, com especial repercussão no maior poder informativo proporcionado. É, também, de destacar a obtenção de melhores resultados no contexto da análise de amostras com quantidades deficientes de DNA degradado, circunstância bastante frequente em perícias de criminalística biológica e de identificação de restos cadavéricos.

Estes resultados otimizados aliados ao incremento do poder informativo são traduzidos no relatório pericial, em especial quando existe concordância de perfis (do vestígio e do suspeito) no caso da criminalística biológica, sendo que a relação da probabilidade do vestígio pertencer ao suspeito e a probabilidade de pertencer a qualquer outro indivíduo da população ser extraordinariamente elevada (LR). Por outro lado, quando se trata da identificação de restos cadavéricos, por exemplo no âmbito de uma investigação criminal, esse incremento de informação genética reveste-se do maior interesse, uma vez que,

frequentemente, a comparação é feita entre as características genéticas desses restos cadavéricos e as dos seus possíveis familiares, cujo grau de parentesco não é, algumas vezes, tão próximo como o que seria desejável. Por isso, a utilização de um maior número de marcadores altamente informativos e que proporcionem resultados mesmo com material degradado é de grande interesse para a conclusão da perícia.

Há, também, um outro aspeto de especial importância quando se está a analisar material genético de uma amostra biológica, que é a determinação do sexo do indivíduo do qual ela provém. Esta determinação é feita concomitantemente com o estudo de STRs autossómicos. Esta possibilidade de determinação do género, através do estudo da Amelogenina, reveste-se do maior interesse, uma vez que há perícias em que esta determinação é relevante.

Nas investigações de parentesco biológico a determinação do género poderá não ter muito interesse, uma vez que, habitualmente, as amostras biológicas são colhidas aos intervenientes no próprio serviço onde irá ser realizada a perícia. Por isso, aquando da colheita dos dados pessoais/processuais e das amostras biológicas o género fica estabelecido. Há, no entanto, casos excecionais, já identificados em diversas ocasiões, que surgem quando se analisa o DNA extraído das amostras e o perito depara-se com resultados que não eram expectáveis. A título de exemplo, refere-se a identificação de um perfil genético feminino obtido a partir de uma amostra de sangue colhida a um pretense pai. A explicação para a obtenção deste resultado ficou clarificada, depois da confirmação, por parte do dador da amostra, de ter sido submetido a um transplante

de medula, tendo a dadora da medula sido a sua irmã (Pinheiro, 2010b).

No que à criminalística biológica diz respeito, a identificação de um perfil genético masculino em amostras relacionadas com um crime, em que a vítima é mulher e o perpetrador é homem, o estudo do gene homólogo da Amelogenina é extremamente importante. A presença de dois picos resultantes da amplificação do DNA de um vestígio biológico, com os kits comerciais geralmente usados nos laboratórios forenses, é indicativa de que o dador desse vestígio é do género masculino, sendo que o pico de menor tamanho corresponde ao do cromossoma X (com a deleção de 6 pb no intrão 1 da Amelogenina) e o restante, que difere do anterior em 4 pb, ao cromossoma Y.

São, atualmente, comercializados kits (*Next-Generation STR Kits*) que podem colmatar as deficiências relativas aos disponíveis até há pouco tempo, em termos de proporcionarem um aumento do poder de discriminação. Para além disso, os produtos de amplificação (alelos) de alguns dos polimorfismos incluídos são de pequeno tamanho (miniSTRs), indicados para a análise de amostras degradadas e/ou com escassa quantidade de material genético. Acresce o incremento do seu desempenho na presença de inibidores, tais como o grupo heme (componente da hemoglobina) existente no sangue. Como foi atrás referenciado, o seu uso pode viabilizar a supressão de um dos passos do percurso laboratorial, a extração do DNA, quando as amostras se encontrarem em suporte apropriado.

Os miniSTRs são produtos de amplificação de tamanho consideravelmente reduzido em relação ao dos STRs convencionais, constituindo uma boa

alternativa, ou mesmo um complemento de um perfil genético parcial obtido a partir da caracterização dos STRs correspondentes. Não obstante terem já sido descritos miniSTRs dos autossomas e dos cromossomas sexuais, apenas os primeiros estão disponíveis em kits comerciais.

Assim, em 2007, foi lançado no mercado o kit AmpFℓSTR®MiniFiler™, que permite a amplificação simultânea de 8 *loci* (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO, FGA) e a Amelogenina, todos eles incluídos no AmpFℓSTR® Identifier™, proporcionando uma redução de tamanho (pb) de 58% e de 48%, respetivamente, nos alelos de menor e de maior tamanho.

O kit AmpFℓSTR® NGM™ inclui 15 STRs, dos quais 5 têm tamanho reduzido (D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391), tendo sido recomendados pelos grupos ENFSI (*European Network of Forensic Science Institutes*) e EDNAP (*European DNA Profiling Group*), com a finalidade de serem adotados na análise de amostras degradadas, a fim de aumentar o desempenho das bases de dados nacionais e apoiar a standardização das bases de dados na Europa (Gill e col. 2006a; Gill e col. 2006b; Lareu e col. 1996; Lareu e col. 1998; Coble & Butler, 2005).

O estudo efetuado em amostras colhidas, após consentimento, a 213 indivíduos são e não relacionados da população do Norte de Portugal, envolvidos em perícias de investigação de paternidade, permitiu concluir que os resultados apoiavam o anunciado incremento do poder informativo proporcionado por este kit para fins forenses, aumentando consideravelmente o poder de discriminação nas análises de rotina, principalmente quando é necessário o estudo de mais marcadores genéticos. Adicionalmente, a análise de miniSTRs incrementa

a possibilidade de tipagem de amostras degradadas (Pontes & Pinheiro, 2011).

Mais recentemente, foi lançado no mercado o NGM SElect que, para além dos STRs referenciados para o NGM, inclui o *locus* SE33 que possui um elevado poder de discriminação. Em estudo realizado numa amostra da população do Norte de Portugal foram identificados 27 alelos para este marcador genético, proporcionando um valor de Pex (Probabilidade de exclusão *a priori*) de 0,8909, tendo em consideração que o valor de Pex acumulado para os 16 STRs autossómicos foi de 0,99999994 (Pinheiro e col., 2005).

A Promega também tem vindo a acompanhar esta evolução, traduzida na produção de sistemas multiplex com interesse forense, tendo vindo a comercializar kits que, basicamente, incluem os mesmos polimorfismos dos da Applied Biosystems, sendo que os de última geração são o PowerPlex® ESX e o PowerPlex® ESI, comparáveis aos atrás mencionados.

A Qiagen tem também investido na produção de kits para a caracterização de STRs autossómicos com fins forenses, como por exemplo o Investigator ESSplex Plus e o Investigator ESSplex SE, evidenciando a rapidez da obtenção dos resultados sem comprometer a sensibilidade e a linearidade dos mesmos.

A nossa experiência com kits da Qiagen, designadamente, o IDPlex STR Kit, que permite a caracterização dos marcadores genéticos incluídos no Identifier, atrás referenciado, é indicativa de se tratar de um kit com bom desempenho, em face dos resultados obtidos em testes de validação efetuados.

É boa prática, em termos de confirmação da reprodutibilidade dos resultados, usar dois kits

comerciais, quando se trata de efetuar comparações indiretas (comparação de perfis genéticos de familiares). A seleção dos kits a utilizar com poder de discriminação similar deve ser objeto de ponderação. Esta ponderação pode incidir em vários aspetos, entre os quais se destaca: a) monitorização da sua qualidade, através da realização de testes de validação; b) seleção de kits de empresas distintas tendo em consideração a identificação de alelos raros ou nulos, uma vez que os *primers* usados para a amplificação dos distintos polimorfismos são diferentes para kits idênticos (caracterização dos mesmos STRs) de empresas distintas; c) avaliação dos kits em termos de qualidade/preço, tendo presente que nem sempre o que é mais oneroso é melhor.

Não obstante terem surgido ao longo dos últimos anos marcadores genéticos para fins de identificação genética humana, bem como para outros propósitos, os STRs autossómicos continuam a ser os preferidos em Genética Forense, por várias razões, algumas das quais já foram explanadas. Todavia, as abordagens metodológicas e tecnológicas têm sofrido uma evolução assinalável, com a introdução de kits mais evoluídos e, concomitantemente, equipamentos cada vez mais sofisticados e exigentes em termos económicos, mas que poderão constituir uma mais-valia, quando se refere ao seu superior desempenho no controlo da qualidade dos resultados.

2.1.2. Análise de misturas

Há situações em que são identificadas misturas de perfis genéticos, em especial nas perícias de criminalística biológica.

Estas misturas surgem quando dois ou mais suspeitos deixam material genético no mesmo objeto (ponta de cigarro fumado, uma lata de refresco, um copo, entre outros suportes).

Há três tipos de amostras, cuja análise genética proporciona, habitualmente, mistura de perfis genéticos: a) zaragoas usadas para colheita de células da cavidade vaginal, anal e/ou bucal, quando tenha ocorrido ejaculação e a colheita tenha sido realizada precocemente; b) zaragoas/estiletos utilizados para colher vestígios subungueais à queixosa e/ou ao suspeito; c) zaragoas empregues para a colheita de células da cavidade bucal em marcas de mordida. A correta e acessível interpretação da mistura dependem, entre outros fatores, da existência de amostras de referência dos contribuidores da mistura (queixosa e suspeito).

As misturas identificadas no contexto da análise de amostras biológicas relacionadas com crimes sexuais são uma realidade frequente, quando não são utilizadas metodologias e tecnologias que permitam a separação do material genético masculino do feminino. Existem, pois, várias limitações metodológicas que complicam a interpretação dos resultados. Importa também sublinhar que grande parte da bibliografia disponível, referente à identificação genética de células epiteliais femininas e células masculinas (espermatozoides), reporta-se a estudos experimentais, utilizando misturas destas células em diferentes concentrações. O comportamento destas misturas pode divergir substancialmente do que acontece nos casos reais, uma vez que nestes está subjacente a interferência de fatores que promovem a degradação do material genético daquelas células, entre outros (Pinheiro, 2011).

É de todo o interesse efetuar a colheita de amostras de referência à vítima e ao suspeito, para que a interpretação dos resultados decorrentes da mistura das suas células seja facilitada. Assim, aquando da colheita de amostras biológicas relacionadas com o crime em vítimas vivas ou em cadáveres (amostras problema) é sempre solicitada, ao médico que realiza a perícia, a colheita de uma amostra de referência. Quanto ao suspeito, a colheita é, em geral, feita pela entidade que realiza a investigação criminal.

Evidencia-se que sem a amostra de referência colhida ao suspeito não pode ser realizada a comparação de perfis. Todavia, o perfil da amostra problema poderá ser inserido na base de dados de perfis de ADN, de acordo com a alínea d) do artigo 15º da Lei 5/2008.

O uso de marcadores genéticos altamente polimórficos, como alguns dos incluídos nos kits para a amplificação de STRs autossómicos, aumenta a probabilidade de serem detetadas diferenças entre os dois componentes da mistura. No entanto, a interpretação e a determinação do número de dadores podem ser tarefas difíceis, especialmente quando estão presentes 3 ou mais contribuidores na mistura.

Em geral, as misturas identificadas na resolução de perícias são constituídas apenas por 2 contribuidores, a vítima (habitualmente mulher) e o agressor (habitualmente homem). Mesmo neste caso a interpretação da mistura pode ser um processo complicado, desde logo porque cada um dos dadores das células constituintes da mistura possui um mínimo de um alelo para cada um dos marcadores analisados, podendo ser detetados, neste caso, um máximo de 4 alelos. Situação ainda mais complexa verifica-se quando

a vítima e o suspeito partilham 1 ou os 2 alelos. A estas limitações acresce o facto da contribuição de cada um deles para a mistura poder ser muito desproporcionada. Por exemplo, quando há uma grande prevalência de DNA feminino, aquando da análise de STRs autossómicos, o perfil feminino pode mascarar o masculino ou o DNA das células femininas competir com o das células masculinas durante a amplificação do DNA.

A probabilidade do sucesso na interpretação de uma mistura depende de vários fatores: a) uso de um número elevado de marcadores genéticos, em que haja uma elevada incidência de heterozigotia; b) relação da quantidade de DNA proveniente de cada contribuidor; c) combinações específicas dos genótipos; d) quantidade total de DNA amplificado (Butler, 2010).

O uso de marcadores genéticos com elevado polimorfismo, traduzido na presença de um elevado número de alelos, aumenta a possibilidade de se determinar diferenças entre os componentes da mistura. A quantidade de DNA de cada contribuidor faz toda a diferença, no que se refere à capacidade para se detetar todos os contribuidores de uma mistura. Assim, por exemplo, se o DNA proveniente de dois indivíduos está presente em quantidades similares será muito mais fácil interpretar a mistura. O menor componente da mistura não é usualmente detetado se estiver presente na mistura numa quantidade abaixo de 5% (proporção de 1:20), pois os alelos do menor contribuidor podem estar mascarados, devido aos efeitos estocásticos, que ocorrem durante a PCR, poderem afetar negativamente a amplificação do componente presente em muito menor quantidade (Butler, 2010).

Podem ser usados *softwares* para ajudar no processo de decifrar os componentes de uma mistura, determinar relações entre as quantidades desses componentes, bem como efetuar cálculos estatísticos. A decomposição da mistura, usando estes *softwares* são considerados “ajudantes do perito”, porque as decisões finais, no que respeita à interpretação da mistura, incide no perito que realiza a análise de DNA.

Entre outros *softwares*, refere-se o Investigator IDproof Mixture Software, da Qiagen, sendo mencionado pelo fornecedor que proporciona a atribuição otimizada dos tamanhos e a designação dos alelos, apoiando as análises de PCR multiplex (<http://www.qiagen.com/products/investigatori-dproofmixturesoftware.aspx>).

2.2. STRS DO CROMOSSOMA Y

2.2.1. Considerações gerais

O cromossoma Y é um cromossoma estruturalmente pequeno, com parte do braço longo (q) formado por heterocromatina. A maior parte do cromossoma Y não recombina, à exceção de duas pequenas regiões distais pseudoautosómicas (PAR1 e PAR2), por serem homólogas com fragmentos do cromossoma X; por este facto, estas regiões não apresentam as propriedades específicas deste cromossoma. A parte não recombinante do cromossoma Y (NRY) apresenta algumas semelhanças com o DNAmT, devido à falta de recombinação durante a meiose e ao modo de herança, neste caso haplóide, uniparental materna. Por isso, a informação genética deste cromossoma vai passando de pai para filho imutável, excluindo as mutações gradualmente acumuladas.

A análise do cromossoma Y possui três principais aplicações na área forense: a) identificação do sexo (masculino); b) identificação do perfil genético, bem como da linhagem masculina (e de todos os homens com ele relacionados pela via paterna); c) identificação da possível origem geográfica dessa linhagem, também designada de ancestralidade genética. A sua principal utilização em criminalística biológica tem incidido, fundamentalmente, na identificação do perfil genético de amostras problema e respetiva comparação com amostra(s) de referência colhida(s) a suspeito(s).

A sua relevância em criminalística biológica deve-se ao facto dos perpetradores serem, maioritariamente, do sexo masculino, com especial ênfase para os crimes sexuais. Contudo, esta sua importância assume a maior utilidade quando os resultados da caracterização destes marcadores corroboram os dos autossomas; caso contrário, e de acordo com o atrás mencionado, a identificação de um perfil genético masculino numa amostra apenas pode fornecer informação parcial sobre a sua proveniência, uma vez que o perfil genético identificado pode pertencer a qualquer outro familiar aparentado pela via paterna com o suspeito ou, ainda, remotamente, com outro qualquer indivíduo da população que, por coincidência, com ele partilhe idêntica informação genética para este cromossoma.

A informação genética proporcionada, através da análise dos STRs do cromossoma Y (Y-STRs), por uma amostra de referência do suspeito (zaragatoa bucal) é partilhada por todos os homens com ele aparentados pela linhagem paterna, como foi dito; ou seja, o seu avô paterno, pai, irmão, filho e até tio paterno partilham

a mesma informação para este cromossoma. No entanto, o facto de ele ser suspeito pressupõe a existência de provas que serão consubstanciadas pela prova pericial de Genética Forense. Por outro lado, frequentemente, a informação proporcionada pelos Y-STRs é suportada pela fornecida pelos STRs dos autossomas, o que incrementa substancialmente a informação da prova pericial. Há, no entanto, casos em que apenas é obtido um perfil genético de Y-STRs.

Os Y-STRs exibem alelos únicos para os diferentes polimorfismos, pelo facto do homem possuir apenas um cromossoma Y (herdado do pai), sendo que o outro cromossoma é o X (herdado da mãe). Os alelos dos diferentes Y-STRs, que à semelhança dos STRs autossómicos são estudados em conjunto (multiplex), segregam como haplótipos intimamente ligados na linhagem masculina de uma família. Por isso, a transmissão faz-se de pai para filho como um único bloco (herança haplóide, uniparental paterna).

A presença de um perfil de Y-STRs nos casos em que a observação microscópica de espermatozoides é negativa pode proporcionar evidência de contacto sexual independentemente da ejaculação, sucesso da lise diferencial (técnica usada para a extração e separação da fração feminina da masculina) ou proporção das células femininas no extrato, podendo ser usada para corroborar o testemunho da vítima feminina de agressão sexual (Pinheiro, 2011).

Há autores que consideram que a obtenção de um perfil genético de Y-STRs só tem interesse se estiver identificado o perfil genético de STRs autossómicos, porque o poder de discriminação dos primeiros marcadores é muito inferior (Gill e col., 1985). Opiniões diversas foram já explanadas,

que se consideram consistentes, na medida em que é preferível ter-se um resultado, embora menos vinculativo do que o dos STRs autossómicos, uma vez que na presença de outras provas incriminatórias poderá coadjuvá-las.

Em meados da década de 90 já tinham sido descritos 13 Y-STRs, dos quais foram seleccionados 9 *loci* (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a/b), cujas unidades de repetição são de três (DYS392) ou quatro nucleótidos (todos os outros), sendo o seu conjunto conhecido pela designação de “haplótipo mínimo”. Este haplótipo foi recomendado pelo *International Forensic Y User Group* como o grupo mínimo de Y-STRs a usar na área forense, com o objetivo de promover a individualização de uma amostra do sexo masculino humano (Pinheiro, 2010b).

O kit AmpFℓSTR® Yfiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) permite a amplificação dos *loci* incluído no haplótipo mínimo, bem como: DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, YGATAH4, proporcionando o mais elevado poder de discriminação dos kits comerciais disponíveis no mercado para a caracterização deste tipo de marcadores.

Em estudo realizado na população do Norte de Portugal foi utilizado este kit, tendo sido publicadas as frequências dos haplótipos identificados, os parâmetros de interesse forense e a comparação das frequências haplotípicas encontradas com as de outras populações. Para além disso, foi descrito um caso, que consistiu na existência de uma duplicação para o DYS19 em simultâneo com uma inconsistência de transmissão alélica entre pretense pai (15,17)/filho (15,16), compatível com a ocorrência de mutação, uma vez que o

Índice de Paternidade era de 1190284082, tendo em consideração os STRs autossômicos (Pontes e col., 2007).

Butler (2011), entre outros autores, descrevem este fenómeno da existência de produtos de PCR presentes em múltiplas cópias, por estes marcadores genéticos se situarem em regiões palindrômicas do cromossoma Y.

Foi estabelecida, por Lutz Roewer e colaboradores uma base de dados de haplótipos de Y-STRs (*Y-STR haplotype reference database — YHRD*), disponibilizada online em 2000, tendo sido atualizada em 2007 (Willuweit & Roewer, 2007). Esta é de livre acesso na internet (<http://www.yhrd.org/>), sendo a mais difundida das bases de dados com interesse em Genética Forense. Para além dos marcadores mencionados, referentes ao haplótipo mínimo, inclui outros (DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, YGATAH4).

O principal objetivo da utilização da base de dados é a determinação da frequência de um determinado haplótipo. Neste momento possui 36.477 haplótipos provenientes de 245 populações, tendo em consideração todas as populações e 14.309 haplótipos de 99 populações Euroasiáticas, incluindo o Norte de Portugal. Esta base de dados representa o repositório mais importante de dados populacionais referentes ao cromossoma Y. Por isso, deve ser usada na estima das frequências dos haplótipos na valorização das perícias de criminalística biológica, em particular quando apenas são obtidos resultados relativos aos Y-STRs. Esta circunstância é relativamente frequente, tendo em consideração a maior sensibilidade dos kits para a caracterização de Y-STRs. Este facto tem sido constatado em estudos efetuados

por vários autores. É de salientar que esta base de dados permite não só a introdução de perfis completos, mas, também, de perfis parciais.

Realça-se os resultados de um estudo efetuado em amostras colhidas a 3 mulheres em intervalos pós-coitais superiores a 48 horas (72, 96, 120, 144 e 168 horas), usando kits para a tipagem de Y-STRs. Apesar de se saber que as células masculinas se mantêm no cérvix pelo menos uma semana após a ejaculação, segundo os autores até à realização deste estudo não tinha sido possível obter um perfil genético do dador a partir de amostras colhidas 3 ou mais dias após o coito. Estes mencionam terem identificado perfis masculinos completos, analisando zaragatoas colhidas no cérvix 3-4 dias após a ejaculação, afirmando ainda terem conseguido perfis incompletos 5-6 dias após o coito (Pinheiro, 2011). Esta constatação comprova o que foi dito anteriormente em relação à sensibilidade destes kits.

O cálculo da concordância ao acaso de haplótipos de Y-STRs é efetuado usando o *counting method* (número de vezes que um determinado haplótipo é observado numa determinada população a dividir pelo número total de haplótipos identificados). Por isso, quanto mais haplótipos estiverem introduzidos na base de dados, mais corretos serão os cálculos estatísticos, relativamente à estima da frequência da concordância de haplótipos (Szibor, 2007).

2.2.2. Análise de misturas

A análise de misturas, tendo em consideração os Y-STRs, é bem mais fácil de efetuar do que com os STRs autossômicos, usando *primers* específicos para o cromossoma Y, uma vez que

aumenta a probabilidade de serem detetados baixos níveis de DNA do perpetrador na presença de uma elevada quantidade de DNA feminino da vítima (Hall & Ballantyne, 2003). Esta facilidade na interpretação dos resultados prende-se com a circunstância dos indivíduos do sexo masculino possuírem apenas um alelo por cada um dos marcadores analisados (exceto o DYS385).

Em face do exposto, se a amostra em causa corresponder a uma mistura, na qual está incluído, por exemplo, o DNA da vítima do sexo feminino, o do companheiro e o de um agressor, é expectável que para os STRs autossómicos possa estar presente um conjunto de seis picos para cada marcador genético, se os três indivíduos envolvidos forem heterozigóticos e não partilhem nenhum dos alelos para esse *locus*. No que concerne ao perfil genético do cromossoma Y, apenas estarão presentes dois picos, um do companheiro e o outro do suspeito, uma vez que para além dos homens só possuírem um alelo por *locus*, a fração feminina da mistura não é amplificada, porque os *primers* para a caracterização dos Y-STRs são específicos para o sexo masculino (Pinheiro, 2010a).

Quando é usada a informação conjunta proporcionada pelos STRs do cromossoma Y e a dos autossomas deve ser evitada a expressão dos resultados num único valor (Likelihood Ratio), por se tratar de marcadores com modos de herança distintos (Amorim, 2008).

2.3. STRS DO CROMOSSOMA X

2.3.1. Considerações gerais

Os STRs do cromossoma X são menos usados na prática forense, podendo ser interessantes:

a) em perícias de investigação de maternidade; b) casos de filiação que envolvam familiares que partilham este cromossoma, na ausência do pretense pai; c) em trios ou duos entre pai e filha; d) em casos de identificação genética de restos cadavéricos, através do estudo de familiares próximos. Em criminalística biológica a sua utilidade é mais restrita (Pinheiro, 2009).

O poder de discriminação (PD) dos marcadores do cromossoma X varia com o género ao qual pertence a amostra biológica. Assim, quando a amostra em estudo é comparada com indivíduos do sexo feminino, os marcadores do cromossoma X devem ser considerados como se de autossomas se tratassem; no caso de a comparação ser feita entre amostras pertencentes a indivíduos do sexo masculino, os valores do poder de discriminação são, em geral, inferiores, porque o único cromossoma X do homem apenas possui um alelo por cada STR. Por isso, os marcadores do cromossoma X proporcionam um poder informativo menor, no que respeita à análise de amostras biológicas relacionadas com crimes do que os autossómicos, uma vez que, como é sabido, a grande maioria dos crimes são praticados por homens (Pinheiro, 2009).

Quando os marcadores genéticos se localizam muito próximos num cromossoma não segregam de forma independente, sendo, por isso, herdados em conjunto (haplótipo), à semelhança do que ocorre com os STRs do cromossoma Y. O cromossoma X possui 4 grupos de marcadores localizados nas regiões Xp22.2, Xq12, Xq26 e Xq28, que podem proporcionar informação genotípica independente. Todavia, atualmente, é proposto usar *clusters* na prática forense para ser definido o correspondente haplótipo. Os pares: DXS10135-DXS8378, DXS7132-DXS10074,

HPRTB-DXS10101 e DXS7423-DXS10134 são um exemplo destes *clusters*. A caracterização destes 4 pares pode ser feita usando o kit Argus-X-8 (Szibor, 2007).

O GEP-ISFG (Grupo Espanhol e Português da Sociedade Internacional de Genética Forense), hoje conhecido pela designação de GHEP-ISFG (Grupo de Habla Espanhola e Portuguesa da Sociedade Internacional de Genética Forense), promoveu a realização de um exercício colaborativo inter-laboratorial que envolveu a participação de mais de 20 laboratórios oriundos da Península Ibérica e de vários países Latino-Americanos. Neste exercício, foi proposta a análise de amostras, usando 10 STRs do cromossoma X (X-STR Decaplex), alguns dos quais comuns ao Argus X-8: DXS8378, DXS9898, DXS7133, GATA31E08, GATA172D05, DXS7423, DXS6809, DXS7132, DXS9902 e DXS6789. Os autores e intervenientes neste exercício referem tratar-se de um multiplex robusto, uma vez que a maioria dos laboratórios participantes caracterizaram com sucesso as amostras distribuídas pelos seus promotores, mencionando a necessidade de dar continuidade a estudos relacionados com este cromossoma (Gusmão e col., 2008). Posteriormente, foram realizados outros estudos com este multiplex, em colaboração com distintos laboratórios (Zarrabeitia e col, 2008; Gusmão e col., 2009).

Recentemente, a Qiagen iniciou a comercialização do kit Investigator Argus X-12, no qual foi adicionado um STR a cada um dos *clusters* atrás referenciados para o Argus X-8. Assim, este kit permite a amplificação simultânea dos 4 grupos de ligamento: grupo 1: DXS10148, DXS10135 e DXS8378; grupo 2: DXS7132, DXS10079 e DXS10074; grupo 3: DXS10103, HPRTB e

DXS10101; grupo 4: DXS10146, DXS10134 e DXS7423. Em estudo realizado em 150 homens da população do Norte de Portugal, usando este kit, foram determinados os parâmetros forenses, os quais permitiram inferir tratar-se de X-STRs promissores, em especial nalgumas perícias de determinação de parentesco biológico. Descreve-se um caso em que a inclusão destes marcadores numa investigação de paternidade, com pretensão pai ausente, em que se dispunha de amostras biológicas da sua mãe, bem como da pretensa neta e da respetiva mãe, se mostrou de grande interesse para a conclusão da perícia. Esta importância foi expressa nos valores de LR, que era de 14 apenas para os STRs autossómicos, tendo aumentado para 6947364312, quando foram incluídos os 12 X-STR (Cainé e col., 2011).

2.4. DNA MITOCONDRIAL

A herança uniparental materna da informação genética do DNAm_t permite determinar a ancestralidade através de várias gerações, ao contrário dos marcadores autossómicos que sofrem recombinação. Por isso, os marcadores de linhagem (DNAm_t e o cromossoma Y), que possibilitam inferir a origem ancestral de uma amostra de DNA, proporcionam um potencial desenvolvimento de meios capazes de conduzir a investigação criminal.

A sequenciação do DNAm_t tem vindo a ser validada para análises forenses em vários laboratórios, tendo vantagens em relação ao DNAnu, tais como: a) proporcionar resultados quando o estudo do DNAnu falha, por estar presente num elevado número de cópias por célula (cerca de 100.000); b) permitir a comparação direta de

sequências de DNA de membros da família da mesma linhagem materna em processos de identificação, por ser transmitido unicamente pela via materna aos descendentes, sem recombinação. Estas duas vantagens são de especial importância na resolução de casos em que o material biológico não contém ou tem pouca quantidade de células, designadamente as hastes de cabelos, restos cadavéricos e pele.

A maior desvantagem do DNAm, em comparação com o DNAnu, é a organização do seu genoma que é muito compacta e, conseqüentemente, menos polimórfico, sendo cerca de 90% do seu genoma codificante.

A análise da região D-loop do DNAm, em especial as regiões hipervariáveis HVI e HVII, permite determinar relações familiares, quando existe um hiato de várias gerações entre um ancestral e descendentes vivos. Esta característica, que é comum ao cromossoma Y, permite a comparação de haplótipos entre familiares, podendo o seu grau de parentesco não ser obrigatoriamente próximo, nos casos de catástrofes, quando os restos cadavéricos estão degradados e a análise de STRs autossómicos já não é possível. O mesmo estudo poderá ser realizado em cadáveres não identificados. No entanto, o DNAm não possui o poder de discriminação dos STRs. Esta análise tem sido usada no SGBF, DN, entre outros casos, no estudo de pelos (cabelos) cortados que foram colhidos de para-brisas e para-choques em veículos relacionados com casos de atropelamento seguidos de fuga.

A utilidade do DNAm na prática forense refere-se, fundamentalmente, à sua análise proporcionar resultados quando a do DNA nuclear falha, aplicando-se em casos em que as únicas

amostras de referência disponíveis são as de parentes de linhagem materna comum, bem como naqueles em que o DNAnu está praticamente ausente (por ex. hastes de pelos) (Pinheiro, 2010b).

Os humanos possuem um mitotipo ancestral comum com origem na população da África subsariana, há cerca de 150.000 — 200.000 anos. As mutações acumuladas desde então deram origem a diferenças, que constituem a base da identificação genética individual. Neste longo período de tempo as populações migraram e expandiram-se, originando diferenças geográficas nas linhagens do DNAm. Este processo reflete-se na distribuição irregular dos tipos de sequências em várias populações.

O DNAm possui limitações na área forense, em especial, quando os mitotipos identificados são comuns. Outros mitotipos são mais raros, havendo uma grande assimetria na sua distribuição. Cerca de 7% da população possui haplótipos idênticos para HVI e HVII e 50% da população pertence a um haplogrupo único (H). Esta constatação permite inferir que o facto de duas amostras possuírem idêntico haplótipo para estas regiões (HVI e HVII) não significa que sejam provenientes do mesmo indivíduo ou, ainda, de familiares da mesma linhagem materna (Butler, 2005).

Estudos efetuados nas duas regiões hipervariáveis do DNAm, bem como noutras variações do genoma mitocondrial, permitiram concluir que os haplogrupos A, B, C, D, E, F e G estão caracteristicamente associados a asiáticos, enquanto os nativos americanos pertencem aos haplogrupos A, B, C e D. Os haplogrupos L1, L2 e L3 são africanos e os haplogrupos H, I, J, K, T, U, V, W e X são tipicamente pertencentes a populações europeias.

A utilização de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) do DNAMt, hoje amplamente divulgada, permite a diferenciação de indivíduos que pertencem aos haplogrupos mais comuns, como é o caso do haplogrupo H em populações europeias.

A maior vantagem do DNAMt, em termos de sequenciação, é que é haplóide e, por isso, existe apenas um tipo para cada indivíduo (exceto as heteroplasmias). Contudo, as amostras correspondentes a misturas de indivíduos não aparentados pela linhagem materna, frequentes no contexto da criminalística biológica, não têm sido alvo de tentativa de decifrar os seus componentes, devido à sua complexidade. No entanto, tem vindo a ser demonstrado que as misturas de DNAMt podem ser interpretadas, através da clonagem e subsequente sequenciação das regiões HVI e HVII das colónias individuais.

Sob a égide do GEP-ISFG foi efetuado o estudo de 5 manchas de sangue de diferentes dadores (M1 – M5), numa mistura (M6) e em 4 fragmentos de hastes de pelos do mesmo indivíduo (M7). Um dos objetivos do trabalho incidiu sobre a possibilidade da amostra M6 ser compatível com a mistura de M4 e M5 (Crespillo e col., 2006). Verificou-se haver um menor número de participantes nesta vertente do exercício, o que demonstra que o DNAMt não é um marcador de eleição na resolução de mistura de perfis em amostras com misturas, bem como na complexidade de interpretação dos resultados.

Tendo como finalidade desenvolver a qualidade e standardização das análises de DNAMt, para além de aspetos técnicos e de interpretação, o mesmo grupo promoveu a realização de um outro exercício. Destacaram-se 3 amostras forenses, sendo que a identificada por M6 correspondia a

uma mistura de sangue (amostra de referência M5) e saliva de um dador desconhecido. Do total dos 26 laboratórios participantes, apenas 18 reportaram o haplótipo correto da mistura, sendo que destes só 2 individualizaram os respetivos haplótipos nos 2 potenciais contribuidores (Prieto e col., 2008). Este facto é revelador da complexidade de interpretação de misturas, usando a análise de DNAMt.

A análise de 80 amostras biológicas colhidas a indivíduos não relacionados da população de Santa Catarina (Brasil) efetuada no SGBF, DN, revelou tratar-se de uma população extremamente heterogénea, principalmente devida ao impacto produzido por ondas de migração recentes de populações europeias. A elevada diversidade de sequências é indicativa de que as análises de DNAMt são muito informativas nesta população, no que respeita à identificação genética (poder de discriminação de 97,69%) (Valverde e col., 2009). No que se refere à população do Norte de Portugal este fenómeno não é observado, pelo que as frequências haplotípicas se mantêm similares ao longo de gerações, o que condiciona o seu poder informativo.

3. AMOSTRAS (VESTÍGIOS) DE INTERESSE EM CRIMINALÍSTICA BIOLÓGICA

Para a análise de DNA com interesse na resolução de casos relacionados com crimes é necessário qualquer tipo de mancha ou produto que contenha material genético, como já foi referido. Este material encontra-se em todas as células nucleadas do organismo e possui características

importantes em estudos de identificação, já que o DNA é único para cada indivíduo, e é idêntico em todas as suas células; ou seja, estudando-se qualquer vestígio biológico pode-se identificar o indivíduo ao qual este pertence (Pinheiro, 2008b).

Os vestígios biológicos envolvidos em casos com interesse forense, mais frequentes, são as manchas de sangue, normalmente relacionadas com homicídios, roubos, furtos ou agressões físicas, e o sêmen com agressões sexuais.

As amostras biológicas podem encontrar-se em suportes porosos e absorventes existentes no local do crime, como sofás, tapetes, alcatifas e mesmo na roupa da vítima ou do autor do crime; ou em suportes não porosos, como diferentes tipos de revestimentos de chão ou paredes de residências, vidros ou cerâmicas (Pinheiro, 2008b).

Há amostras que se encontram em suportes que, pelas suas dimensões ou outras características, não são suscetíveis de serem enviadas para os serviços que realizam as respetivas perícias forenses. Neste caso, pode-se proceder à transferência do vestígio do suporte original para uma zaragatoa humedecida com água ultrapura (MilliQ), sendo a extração do DNA realizada a partir deste último suporte.

As manchas existentes em pedaços de madeira, pedras ou terra, podem proporcionar maus resultados, devido às características de absorção destes suportes, bem como à presença de inibidores. Um requisito imprescindível para o êxito da análise é que as manchas sejam rapidamente secas e adequadamente acondicionadas, de forma a preservar o seu material genético.

As amostras biológicas que mais vezes estão relacionadas com perícias de Genética Forense são: o sangue, sêmen, saliva, pelos e células epiteliais.

Os crimes relativos aos quais são solicitadas perícias de Genética Forense são, em geral, homicídios, agressões sexuais, agressões físicas, roubos e furtos. O objetivo do envio de amostras biológicas, para os laboratórios forenses, existentes em suportes variados, reside na sua identificação genética.

É de realçar que a maioria delas referem-se ao estudo de DNA humano; todavia, podem-se também efetuar perícias em amostras de DNA não humano. Este DNA não se reporta exclusivamente a DNA animal, sendo, contudo, este o DNA mais vezes envolvido em delitos. Os pelos de animais são, provavelmente, as amostras biológicas não humanas mais vezes presentes, por serem encontradas em locais de crime, sendo, por isso, consideradas potenciais evidências na resolução de crimes violentos. Esta constatação é explicada pelo facto de haver uma grande percentagem de gatos e cães domésticos que coabitam com os seus donos, em especial nos países ocidentais. Os pelos detetados em peças de vestuário, em casas, carros, entre outros locais, são facilmente transferidos nas atividades domésticas diárias (Pinheiro, 2010c).

Os resultados obtidos das análises efetuadas a amostras biológicas no âmbito da criminalística biológica traduzem-se na identificação de perfis genéticos. Como a maioria dos delitos são perpetradas por homens, o que se pretende é a identificação de um perfil genético masculino que venha a ser concordante com o de um suspeito.

As amostras biológicas podem ser colhidas no corpo da vítima, do suspeito e/ou do local do crime. Em relação às amostras biológicas existentes noutro tipo de suportes que não o corpo da vítima, a sua recuperação, em geral, não é

urgente, uma vez o material genético permanece intacto num período de tempo longo, exceto se for submetido a fatores adversos (humidade, temperaturas muito elevadas, luz solar, raios UV), durante o tempo suficiente para ocorrer a sua degradação total. Estes suportes podem ser peças de roupa de cama, peças de vestuário e material não transportável ou outro, cuja remoção do local é perfeitamente evitável (chão, móveis, objetos diversos), porque a colheita dos vestígios pode ser feita com recurso a zaragoas ligeiramente humedecidas (Pinheiro, 2011).

Em 1997, Sweet e col. preconizaram a utilização deste procedimento seguido do uso de uma zaragoa seca (técnica da dupla zaragoa). Os autores efetuaram, posteriormente, um estudo comparativo dos dois métodos de colheita, tendo concluído não haver diferenças significativas na recuperação da amostra biológica. Esta metodologia de colheita pode aplicar-se a amostras relativas a outro tipo de crime (Graham & Rutty, 2008).

São aconselhados procedimentos para que as amostras biológicas mantenham a sua autenticidade e integridade, a fim de terem valor probatório em sede de julgamento. A autenticidade certifica que as amostras submetidas à análise e à elaboração do respetivo relatório pericial foram as colhidas, tendo sido no momento da colheita devidamente identificadas. A integridade constitui uma garantia de que o material genético mantém as suas características que, em princípio, assegurarão a possibilidade de serem obtidos resultados (Pinheiro, 2011).

É indispensável que seja assegurada a cadeia de custódia das amostras biológicas submetidas a perícia de Genética Forense. A cadeia de custódia é um processo usado para documentar

o seu trajeto cronológico, a fim de ser atestada e acautelada a sua autenticidade em processos judiciais. Existem sistemas de gestão e de informação úteis, os sistemas LIMS (*Laboratory Information Management System*), podendo ser adquiridas e adaptadas versões especialmente concebidas para laboratórios forenses que integram várias tarefas, entre as quais se destaca o registo de todo o trajeto das amostras biológicas. Estes sistemas conjuntamente com documentação/registo, especialmente criados para o efeito asseguram de forma cabal a referida custódia (Pinheiro, 2011).

3.1. HOMICÍDIOS

Nos crimes de homicídio podem ser encontrados no local do crime e/ou no corpo da vítima qualquer um dos tipos, alguns dos tipos ou, ainda todos os tipos de amostras biológicas atrás referenciadas.

A utilização de objetos contundentes, cortantes, perfurantes, entre outros na prática de crimes violentos, pode resultar na produção de ferimentos com a consequente perda de sangue.

Por sua vez, o sémen também pode estar presente, sendo que poderá resultar da ejaculação do perpetrador antes ou depois de ocorrer a morte da vítima. A sua localização pode ser diversa, podendo ser identificado nas cavidades vaginais e/ou anais da vítima, bem como na cavidade bucal. Evidencia-se que a sua presença nas zonas circundantes destas cavidades também podem ser alvo de colheita. A sua localização pode ser identificada noutras zonas exteriores do corpo do cadáver, em peças de vestuário, roupa de cama, bem como em outros suportes.

A saliva pode ser encontrada no corpo da vítima, salientando-se as marcas de mordida que serão, em princípio, os únicos pontos onde esta amostra poderá ser colhida, uma vez que a haver saliva noutras zonas, se não existirem marcas, será difícil identificar a sua localização, sem a contribuição da própria vítima, que neste caso é cadáver. A saliva pode estar em objetos encontrados no local do crime, sendo óbvia a sua presença nalguns deles, como copos, garrafas, latas de refresco, entre outros. Assinala-se a importância da recolha de cigarros fumados, detetando-se, por vezes misturas (em geral de dois contribuidores).

Os pelos são omnipresentes em todos os locais e nos mais variados suportes, pois o couro cabeludo humano possui entre 100.000 a 150.000 folículos pilosos que produzem pelos, sem ter em consideração outras zonas do corpo, das quais estes também podem ser originários. A circunstância de serem encontradas quantidades abundantes de pelos de diferentes proveniências (de indivíduos diversos, de zonas corporais distintas e de pelos animais) deve-se ao facto de estarem em fase telogénica do seu desenvolvimento; ou seja, na etapa em que as células do folículo piloso e raiz (também designada de bolbo) sofreram a apoptose celular e, por conseguinte, os pelos terem caído. Caso diverso é a eventualidade de ser encontrada uma madeixa de pelos na mão de um cadáver, facto que é altamente sugestivo de pertencer ao agressor. Por outro lado, por se tratar de pelos arrancados (confirmação microscópica) aumenta a possibilidade de êxito na identificação da sua proveniência. Esta circunstância advém dos pelos possuírem raiz em plena vitalidade (bolbo oco) e, por isso, detentora de quantidades apreciáveis de material genético, o que proporcionará a sua

identificação genética com recurso apenas ao estudo do DNA nuclear.

As células epiteliais encontram-se com bastante frequência neste tipo de crimes violentos, tanto nos vestígios subungueais colhidos à vítima como ao agressor. Importa, portanto, preservar as mãos da vítima, para que sejam colhidos aquando da realização da autópsia médico-legal. Por isso, as mãos do cadáver devem ser protegidas com sacos de papel, aquando da realização do exame ao local do crime.

Estas células podem estar presentes noutras localizações, designadamente em objetos existentes no local do crime, que foram tocados pelo agressor.

Na superfície da pele humana existem células que podem ficar aderentes a uma qualquer superfície que seja tocada. Estas células têm origem na descamação da pele (perde-se cerca de 400.000 células por dia) e também em secreções produzidas pelas glândulas sudoríparas e sebáceas, que arrastam células da pele. Quando existe um contacto da pele com qualquer objeto, o suor e o óleo sebáceo ficam aderentes a esse objeto, podendo também ficar depositadas algumas células (Lagoa & Pinheiro, 2006).

Por isso, estas células podem estar presentes em impressões dermopapilares, que serão objeto de exame dactiloscópico; no entanto, a sua colheita, poderá, para além deste fim, ser usada para a identificação genética do seu dador. Esta colheita deve ser feita antes de serem usadas substâncias para a sua revelação, não obstante haver estudos indicativos da obtenção de resultados mesmo após o uso de determinados tipos de produtos para a revelação daquelas impressões (Balogh e col., 2003; Lowe e col., 2003).

3.2. AGRESSÕES SEXUAIS

Durante o exame físico é efetuada uma minuciosa inspeção de toda a superfície corporal da vítima. Esta pode conduzir à obtenção de amostras biológicas que possam conter células do suspeito que permaneçam nos exsudados vaginais, bucais e/ou anais, raspados subungueais, pelos, especialmente da região púbica e manchas existentes no corpo da vítima. É de interesse relevante a preservação e posterior análise genética de roupas, pensos higiênicos, objetos específicos e amostras de referência (Pinheiro, 2008a).

Qualquer dos tipos de amostras biológicas atrás mencionadas pode ser colhido no âmbito de crimes sexuais, quer às vítimas mortais ou vivas quer no local do crime.

A presença de sémen em amostras relacionadas com delitos sexuais é essencial para a presunção da natureza sexual do crime. Contudo, a circunstância de ter sido identificado um perfil genético masculino em amostra de sémen, no âmbito de uma suposta agressão sexual em queixosa do sexo feminino, não é prova suficiente para a comprovação da existência de crime.

A identificação do perfil genético do agressor em manchas de material biológico que lhe pertença pode ser efetuada meses ou anos após a ocorrência do crime, porque o material genético é resistente à degradação. Contudo, como foi referido, neste tipo de crimes a amostra que tem mais interesse é o sémen. Quando a colheita deste é efetuada nas cavidades vaginal, anal ou bucal da vítima, os resultados genéticos dependem em grande parte do tempo que medeia entre a prática do crime, o exame à vítima e a respetiva colheita. Estes condicionalismos também estão

relacionados com agentes que existem nestas cavidades responsáveis pela degradação do DNA (Pinheiro, 2011).

A presença de espermatozoides aparentemente intactos na cavidade vaginal associada a um intervalo pós-coital prolongado pode inviabilizar a identificação genética, por ter havido degradação do DNA. Esta degradação pode ser devida à exposição prolongada dos espermatozoides na vagina, que desencadeia a adesão de células femininas lisadas às suas cabeças, sendo que desta interação resulta a produção de nucleases e a consequente degradação do DNA (Elliott, 2003).

Nesta perspetiva, evidenciam-se fatores potenciadores da degradação dos espermatozoides que atuam nas diferentes cavidades das quais são colhidas evidências. Assim, destaca-se o facto da cavidade vaginal ser quente, ácida e húmida. A boca e o ânus são também cavidades em que tem sido verificada a rápida destruição dos espermatozoides pela atuação, respetivamente, de enzimas salivares e de enzimas produzidas por bactérias (Sibille, 2002).

Por várias razões as vítimas não mortais de agressões sexuais só são submetidas a exame médico, e à respetiva colheita de amostras biológicas, mais de 24-36 horas depois de ocorrido o evento, sendo que neste período ainda é possível identificar perfis de STRs autossómicos. Todavia, quando este intervalo excede as 48 horas aquela identificação não é, em geral, viável, embora esta inviabilidade não seja devida à ausência de células masculinas. Há estudos relacionados com a reprodução demonstrativos da presença de vários espermatozoides no cérvix humano 7 dias após o coito, o que é consistente com o conceito de

que este local é o repositório de sémen antes de ocorrer a fertilização (Hall & Ballantyne, 2003).

Esta verificação, ao contrário do que seria expectável, não invalida o facto de se constatar ausência de resultados referentes à identificação de células masculinas, apesar de serem usados métodos sensíveis na análise de DNA.

O método de lise diferencial foi a metodologia *standard* usada nos laboratórios forenses para separar os espermatozoides das células epiteliais da vítima. Este método utiliza diferenças específicas na composição química das membranas das respetivas células. Nesta perspetiva, efetua-se uma primeira lise das células não espermáticas, procedendo-se de seguida a lavagens para remover resíduos de DNA exógeno. Embora este método possa, em geral, proporcionar duas frações celulares, a separação não é sempre completa, podendo haver transição de células de uma fração para outra, fazendo com que a interpretação dos resultados e a respetiva análise estatística constitua um verdadeiro desafio. As limitações adicionais desta técnica prendem-se, fundamentalmente, com a lise prematura e perda de espermatozoides na primeira digestão e nos múltiplos passos de transferências e lavagens, que reduzem a recuperação das células. Uma alternativa da separação química é a separação através da seleção física direta de células “alvo” (espermatozoides) da mistura (Sanders e col., 2006).

Em 2003, a mesma equipa que descreveu o método de lise diferencial preconizou o uso da microdissecção a laser (*Laser Microdissection* – LMD) como sendo uma tecnologia útil na análise de DNA para identificação e isolamento de espermatozoides a partir de células epiteliais da vítima, em amostras relacionadas com crimes sexuais. Trabalhos posteriormente publicados vieram a demonstrar

que a LMD também conhecida por LCM (*Laser Capture Microdissection*), apresenta algumas limitações, designadamente o preço do equipamento (microscópio) e a elevada quantidade exigida de material genético masculino, traduzida na presença de espermatozoides preservados, para possibilitar a obtenção de um perfil genético masculino completo (STRs autossómicos) (Pinheiro, 2011).

Tem havido, por parte da comunidade científica forense, um grande investimento no progresso técnico desta área, conforme se pode avaliar através da profusa bibliografia existente sobre vários aspetos relacionados com a identificação genética em amostras biológicas referentes a crimes sexuais. Contudo, as múltiplas variáveis e desafios que se podem colocar durante o estudo destas amostras têm redundado em resultados periciais que, por vezes, ficam aquém do esperado. A esta inabilidade para alcançar resultados laboratoriais conclusivos de perícias em que seria de esperar a identificação do perfil genético do agressor, acresce a impossibilidade de, num número relativamente elevado de casos, a investigação criminal não conseguir identificá-lo. Este impedimento deve-se à falta de informação proporcionada pela vítima acerca do perpetrador e à índole do próprio crime sexual, mormente relacionada com a ausência de testemunhas (Pinheiro, 2011).

Não obstante poder haver outras provas materiais que não as genéticas que possam contribuir para a condenação de um suspeito, o valor probatório destas últimas é significativamente superior. Têm sido divulgados casos nos Estados Unidos relativamente aos quais foram cometidos erros judiciais graves, devido à ausência de provas de acusação seguras. O “*Innocence Project*” é uma organização dedicada à revisão de casos julgados e

a modificar o sistema de justiça criminal para prevenir futuras injustiças. Desde 1992 conseguiu que os tribunais reconhecessem a existência de erros judiciários, de tal modo que até finais de Março de 2011 foi declarada a inocência de 267 condenados através de estudos de DNA (Pinheiro, 2011).

3.3. AGRESSÕES FÍSICAS, ROUBOS E FURTOS

Quanto a estes tipos de crimes a amostra mais frequentemente detetada é o sangue, apesar de poderem existir os restantes tipos de amostras biológicas, à exceção do sémen; isto é, saliva, pelos e células epiteliais.

4. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS (VESTÍGIOS) DE INTERESSE EM CRIMINALÍSTICA BIOLÓGICA

4.1. SANGUE

O sangue é o tipo de amostra mais frequentemente analisada no âmbito da investigação criminal, sob a forma de manchas secas, pelo facto de haver, no caso da prática dos crimes mencionados, um número elevado de objetos ou peças de roupa e/ou do próprio local do delito impregnados com este fluído biológico.

O sangue é uma suspensão de leucócitos (glóbulos brancos), eritrócitos (glóbulos vermelhos ou hemácias) e plaquetas (fatores de coagulação sanguínea), no plasma. Cada mililitro de sangue de um adulto normal contém entre 3.800 a 9.800 milhões de leucócitos.

O DNA é extraído dos leucócitos do sangue, uma vez que os eritrócitos são células anucleadas.

Esta extração é efetuada mediante a utilização de diferentes protocolos, sendo os mais usados os que utilizam o Chelex ou a extração orgânica, com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Esta última metodologia é quase exclusivamente empregue no caso da amostra de sangue se encontrar em precárias condições de conservação, como o sangue cadavérico em estado líquido, colhido e conservado durante bastante tempo antes da realização da sua análise genética. Normalmente esta situação ocorre quando o patologista forense não vislumbrou interesse na sua colheita, por não haver suspeita de crime, e ter de se recorrer ao remanescente da amostra de sangue enviada para o Serviço de Toxicologia Forense (Pinheiro, 2008b).

As perícias que envolvem esta amostra biológica são, habitualmente, concluídas com sucesso, havendo, porém, casos excecionais em que, não obstante as manchas de sangue serem visíveis e serem envidados todos os esforços metodológicos e tecnológicos no sentido de serem obtidos resultados, a sua análise apenas proporciona perfis parciais ou mesmo ausência de resultados. Esta circunstância é interpretada como sendo devida à presença de inibidores (grupo heme), que é confirmada quando se faz a quantificação do material genético da amostra por Real-Time qPCR, metodologia que, para além de determinar a quantidade de DNA, identifica a presença de inibidores.

4.2. SÉMEN

O sémen é uma suspensão de espermatozoides no líquido seminal. Um mililitro de sémen contém entre 60 a 120 milhões de espermatozoides. Esta quantidade é suficiente para que, na maioria das perícias em que esteja presente

sémen, seja viável a identificação genética do seu dador, não obstante as adversidades atrás descritas, relacionadas com o meio de onde estes são recuperados.

O DNA a analisar é extraído, maioritariamente, dos espermatozoides, efetuando-se, previamente, a confirmação microscópica da sua existência, no caso de serem presentes esfregaços em lâmina, efetuados a partir de exsudados colhidos à queixosa. É, também, prática corrente realizar testes preliminares, a fim de se averiguar a presença de sémen. Contudo, a sensibilidade destes testes é precária, diminuindo com vários fatores, entre os quais se destaca o tempo. O que significa que estes testes são meramente de orientação, embora, não raras vezes, e apesar de serem negativos é identificado um perfil genético masculino. Por isso, e em qualquer das circunstâncias, deve proceder-se à extração do DNA da amostra biológica.

A ausência de espermatozoides pode ser devida a vários fatores, designadamente: a) ao longo período que medeia entre a ejaculação e a colheita de amostras; b) à penetração sem ejaculação; c) anomalias no aparelho reprodutor do agressor. Nas duas últimas situações a quantidade de DNA seminal é muito escassa, porque os espermatozoides representam a principal fonte de DNA nos ejaculados necessários à subsequente identificação dos perfis genéticos (Soares-Vieira, 2007).

O sémen pode ser identificado em zaragoas colhidas nas cavidades (vaginal, anal, bucal) ou no exterior do corpo da vítima, em peças de vestuário que esta envergava aquando da prática do crime, evidenciando-se as cuecas e/ou outras peças de roupa íntimas que, com frequência, são suportes

que contêm manchas. Tem sido analisado outro tipo de suportes com sémen (Pinheiro, 2011).

4.3. SALIVA

Um indivíduo saudável produz entre 1 a 1,5 litros de saliva por dia, podendo ocorrer a sua transferência, bem como a de células epiteliais que nela estão retidas. Esta transferência pode suceder por contacto, tais como em produtos alimentares, contentores de bebidas, pontas de cigarro, envelopes ou em crimes sexuais em que houve ejaculação na cavidade bucal. A transferência também pode dar-se por deposição de partículas de saliva, tais como as que aderem a uma máscara ou a um telefone (Goodwin e col., 2007).

A saliva, apesar de não conter células na sua constituição, por transportar células epiteliais da cavidade bucal, possui DNA. As amostras que contenham saliva, tais como mordidas infligidas às vítimas, filtros de cigarros fumados, garrafas ou latas de refrigerantes e, ainda, selos ou envelopes, são suscetíveis de permitir a identificação do agressor. A saliva presente em peças de vestuário e/ou roupa de cama só será objeto de estudo se houver indicações da sua presença, uma vez que se trata de um produto incolor e que não dá mais consistência ao tecido, ao contrário, por exemplo, do sémen.

A saliva contém água e glicoproteínas, para além doutros componentes, designadamente a enzima amílase (alfa-amílase, denominada ptialina). As células presentes num mililitro de saliva variam entre 100.000 – 400.000. A pesquisa da alfa-amílase, em amostras biológicas submetidas a perícia de Genética Forense, pode ser efetuada mediante a utilização de produtos da Phadebas,

divididos em duas categorias: “*Press Test*” e “*Tube Test*”, constituindo estes ensaios preliminares apenas testes de orientação. A amilase está presente na saliva numa concentração superior a 50 relativamente a outro fluido corporal (Goodwin e col., 2007). O percurso laboratorial destas amostras é idêntico ao realizado para as restantes amostras biológicas.

4.4. PELOS

Os pelos podem ser retirados de peças de vestuário, das mãos, ou de qualquer outra localização do corpo da vítima, ou ainda do local do crime, devendo ser colhidos e acondicionados com precaução, por várias razões, entre as quais se destaca o facto de poderem ser provenientes de pessoas distintas. Estes podem ser transferidos durante o contacto físico, por isso a sua presença pode permitir a associação de um suspeito a uma vítima ou a do suspeito/vítima a um local de crime.

Esta associação é particularmente útil em crimes violentos, tais como homicídios, crimes sexuais e agressões físicas, em que ocorreu contacto físico, podendo ter havido transferência de pelos. Outros crimes, como os assaltos a residências e roubos envolvem, em geral, a colheita de vestígios subungueais e manchas de peças de roupa, que podem conter pelos úteis na identificação dos suspeitos (Deedrick, 2000).

O tipo de pelos recuperados, as suas condições morfológicas e o número encontrado são fatores com impacto no seu valor, enquanto evidência, na investigação criminal.

Nos humanos existem pelos em diversas partes do corpo, possuindo características que podem possibilitar a determinação da sua proveniência,

no que respeita à região corporal. Todavia, na perspectiva da Genética Forense esta determinação não é relevante, o que importa é o estabelecimento do respetivo perfil genético, pelo que no SGBF, DN se usa o termo pelo, independentemente da sua origem, mesmo que se trate de um pelo com um comprimento apenas compatível com o de um pelo proveniente do couro cabeludo (cabelo). Esta opção prende-se com a circunstância de se evitar usar terminologia inadequada, quando se trata de uma perícia que envolve um grande número de vestígios deste tipo e, por isso, se torna difícil usar a nomenclatura correcta, no que se refere à localização corporal.

O couro cabeludo humano contém um elevado número de folículos pilosos, que produzem pelos, como anteriormente mencionado, atravessando três fases de desenvolvimento, a anagene, em que o pelo se encontra em crescimento ativo, e cuja duração varia de 2 a 8 anos; a catagene, em que se verifica a paragem da actividade celular; a telogene, quando ocorre a morte das células (apoptose celular), havendo a quebra da dupla cadeia do DNA das raízes dos pelos, e estes acabam por cair (Pinheiro, 2008b).

Os pelos são maioritariamente constituídos por queratina (proteína), pequenas quantidades de metais, ar e pigmento, a melanina, sendo esta última, um potente inibidor da amplificação (PCR). Por isso, quando são presentes para estudo do DNA hastes de pelos, ou mesmo raízes de pelos que caíram espontaneamente, sem tecidos do folículo piloso aderentes, não se obtêm resultados quando se estuda apenas DNA nuclear. Acresce ainda a possibilidade da existência de fatores que possam impedir uma eficaz extração do DNA, como os tratamentos químicos, resistentes aos

métodos de digestão enzimática que usam ditio-treitol, proteinase K, detergentes e o aquecimento para dissolver o pelo (Pinheiro, 2008b).

De acordo com o atrás referenciado, a observação microscópica do pelo não tem como objetivo a determinação da região corporal da sua proveniência, mas desde logo permitir estabelecer se o pelo é humano ou animal, bem como observar cuidadosamente a raiz, no sentido de se poder inferir a sua fase de desenvolvimento (anagene, catagene ou telogene), o que permitirá decidir acerca da estratégia a seguir com a finalidade de determinar o seu perfil genético.

Num indivíduo são, 80% a 90 % dos folículos pilosos da cabeça (cabelos) estão na fase anagénica, 2% catagénica e 10% a 18% telogénica. O período médio de crescimento do pelo (cabelo) é aproximadamente 1.000 dias, sendo que as restantes fases ocorrem num período de 100 dias. Aproximadamente 10% dos pelos da cabeça humana, os cabelos, representando entre 100 e 1.000, encontram-se na fase telogénica. Estes pelos destacar-se-ão do folículo inativo se a mínima força, ou combinação de forças, forem exercidas (Deedrick, 2000).

Estruturalmente, o pelo é constituído por três partes principais: cutícula ou epidermícula, córtex ou substância cortical e medula ou canal medular. O exame microscópico do pelo pressupõe a observação cuidadosa destas estruturas e permite distinguir pelos humanos de não humanos. Em especial as características da medula podem facultar a determinação da espécie animal à qual o pelo pertence. Evidencia-se, no entanto, que este tipo de perícia é apenas acessível a peritos muito experientes nesta área, sendo que porventura os resultados alcançados podem não trazer qualquer

mais-valia para a investigação criminal. Por isso, reitera-se a ideia de que a identificação da espécie à qual o pelo pertence, bem como a identificação do respetivo perfil genético, no caso dos pelos humanos, se adequa mais ao que é pretendido em termos de identificação do seu dador do que um exame exaustivo às suas características morfológicas que, em qualquer circunstância, nunca permitirá a identificação do seu dador.

A camada exterior das células do pelo, a cutícula, é composta por células sobrepostas ou escamas, cuja principal função é manter a integridade do pelo e impedir a transferência de substâncias solúveis do exterior para o interior. A disposição das células da cutícula é diferente nos pelos humanos e na dos animais.

Nos pelos humanos o córtex, que constitui a maior parte do pelo, consiste, basicamente, em células alongadas e material intercelular. Os grânulos de pigmento são pequenos, esféricos com um diâmetro de 0,2 a 0,8 μm . Estes são compostos por melanina, sendo que há 2 tipos: eumelanina (cor castanha e preta) e feomelanina (cor loura e ruiva). A medula representa a parte central do pelo, sendo que não está presente em todos os pelos humanos e, quando presente, esta pode ser contínua ou descontínua. Dependendo do tipo de pelos e da sua proveniência (humana ou não humana) o diâmetro da medula é muito variável. Pode constituir de 0% a 95% do pelo (Gaudette, 2000a).

A fim de se determinar se os pelos são humanos ou de animal, há vários parâmetros a ter em consideração, designadamente, o comprimento, diâmetro, cor, tratamento, medula, índice medular, distribuição da pigmentação, haste, raiz, extremidade, escamas, secção transversal (Gaudette, 2000b).

Algumas destas características só são visíveis ao microscópio, como: o diâmetro, a medula e, por conseguinte, a determinação do índice medular, a distribuição da pigmentação, a raiz, a extremidade, as escamas e a secção transversal.

Destas, serão apenas referenciadas as que têm maior importância no contexto das perícias de Genética Forense. O diâmetro do pelo humano possui de 0,05 – 0,15 milímetros, o dos animais pode ser idêntico ou muito diferente; a medula dos animais pode ter um complexo regular e geométrico de células; o índice medular (razão entre o diâmetro da medula e o diâmetro do pelo) nos pelos humanos é quase sempre inferior a 1/3 e nos animais é, usualmente, superior a 1/3. As escamas (células de revestimento) dos pelos humanos formam um padrão irregular e anular, enquanto as dos animais possuem uma variedade de tipos, podendo o mesmo pelo exibir mais do que um tipo.

4.5. CÉLULAS EPITELIAIS

De acordo com o atrás referido as células epiteliais podem ter diversas proveniências no que respeita à região corporal, para além de poderem estar presentes em distintos suportes.

Importa, também evidenciar que estas células podem ter origem em objetos tocados. A quantidade de material celular transferido depende do tempo que a pele esteve em contacto com o objeto, da pressão aplicada, da presença de fluidos, como o suor que intervém na sua transferência. Alguns indivíduos transferem células da sua pele mais facilmente do que outros; estes indivíduos são classificados como bons dadores/propagadores. Assim, qualquer superfície com

que o perpetrador contactou no local do crime, incluindo marcas de contacto com a vítima, pode conter as suas células epiteliais. Na maioria dos casos, o baixo número destas células, provenientes apenas de contacto, proporciona um sucesso muito limitado na obtenção de um perfil de DNA. Os métodos de visualização destes vestígios dermopapilares, como por exemplo o uso da ninidrina (corante usado na rotina para visualização de impressões digitais latentes), que deteta a presença de aminoácidos, podem ser úteis na identificação de amostras que contenham este tipo de células (Goodwin e col., 2007).

O tipo de suporte sobre o qual a impressão digital está depositada é também muito importante. É interessante perceber que as superfícies habitualmente consideradas ideais para a visualização e transplante de impressões digitais (lisas e não porosas, como vidro e metal) são menos adequadas para a recuperação de DNA vestigial. Enquanto superfícies habitualmente inadequadas para fins lofoscópicos (superfícies rugosas), são bons suportes para a recolha de DNA vestigial (Lagoa & Pinheiro, 2006).

5. VALORIZAÇÃO DA PROVA

As perícias do âmbito da criminalística biológica têm, em geral, como principal objetivo a identificação do autor do crime. Esta identificação é efetuada pelos órgãos de investigação criminal que solicitam perícias aos laboratórios forenses, no sentido de os coadjuvarem na descoberta da verdade.

Este tipo de perícia pressupõe várias fases que incluem o estudo laboratorial, a análise dos resultados tendo em vista a comparação dos perfis

genéticos, a valorização estatística dos mesmos se os perfis forem idênticos, e a elaboração do relatório pericial. Este deve ser exaustivo, referindo-se e descrevendo-se todo o material recebido, testes preliminares efetuados, técnicas usadas na extração do DNA, métodos de tipagem e resultados obtidos. As conclusões devem incluir as comparações das características genéticas das amostras biológicas presentes a exame e as mesmas características de amostras biológicas colhidas à vítima e suspeito/suspeitos.

As conclusões possíveis são três: a) os perfis de DNA do suspeito e da(s) amostra(s) biológica(s) (cujas características genéticas não são idênticas às da vítima e que há indícios de que possam pertencer ao suspeito) não são idênticos; b) há concordância dos referidos perfis; c) o estudo não é conclusivo.

Quando há concordância de perfis genéticos efetua-se a valorização estatística dos resultados, recorrendo ao teorema de Bayes, que permite determinar as probabilidades finais de um sucesso a partir de probabilidades iniciais. Esta probabilidade inicial, designada de probabilidade *a priori*, deve ser fornecida pelo juiz face ao seu conhecimento do processo judicial que deu origem à investigação (Carracedo, 1999).

Em face do exposto, para se fazer a valorização objetiva da prova científica basta multiplicar o valor da probabilidade *a priori* (grau de crença, por parte do juiz, de que a amostra pertença a um determinado indivíduo) pela razão de verosimilhança ou Likelihood Ratio (razão bayesiana de probabilidades), obtendo-se a probabilidade *a posteriori*.

Quando o valor da probabilidade *a priori* não é fornecido atribui-se o valor de 0,5, considerando-se

que a probabilidade da mancha provir de um determinado indivíduo é igual à de proceder de indivíduo distinto, não tendo em consideração a prova genética.

Se se analisar uma amostra biológica, cujas características genéticas são idênticas à do indivíduo com quem se pretende efetuar a comparação, normalmente o suspeito, para se determinar a probabilidade de que a amostra provenha do indivíduo mencionado, têm de ser consideradas, pelo menos, duas hipóteses alternativas possíveis e que se excluem mutuamente. A hipótese H1, que se refere à possibilidade da amostra biológica provir do indivíduo mencionado, atendendo aos resultados genéticos observados; e a hipótese H2 respeitante à possibilidade da amostra provir de outro indivíduo que não aquele. Tendo em consideração estas duas hipóteses obtém-se a razão de verosimilhança ou razão bayesiana de probabilidades, também designada de LR, usando a seguinte fórmula:

$$LR = \frac{\text{Prob. dos resultados genéticos se H1 é verdadeira}}{\text{Prob. dos resultados genéticos se H2 é verdadeira}}$$

Se forem utilizados *loci* independentes, o cálculo do valor de LR será simplesmente o produto do inverso das frequências dos fenótipos dos resultados genéticos dos marcadores estudados para a resolução do caso, tendo em consideração a população de referência adequada.

O valor de LR encontrado (X) indica que é X vezes mais provável que sejam observados os resultados genéticos, assumindo que a amostra pertença ao indivíduo em questão, comparada com a possibilidade de não pertencer.

Evett (1987), à semelhança de Hummel para os casos de filiação, elaborou uma escala em que figuram os valores de LR obtidos e os correspondentes predicados verbais, indicativos da força da prova (Tabela 1).

Tabela 1. Tabela de Evett.

Likelihood Ratio (LR)	Evidência da prova
1-33	Fraca
33-100	Regular
100-330	Boa
330-1000	Forte
Superior a 1000	Muito forte

O uso da escala de Evett deve ser evitado, uma vez que é difícil transmitir o significado dos predicados verbais, para além de hipervalorizar a prova científica. Do ponto de vista prático, tais predicados podem induzir o juiz a tomar uma decisão, baseada nos referidos predicados que correspondam a valores de LR que, em determinadas circunstâncias (se o suspeito para alguns dos sistemas utilizados possui alelos pouco frequentes na população), não correspondam à realidade.

A probabilidade de concordância, não raras vezes, é confundida com a probabilidade de coincidência ou probabilidade de *matching*. Trata-se, porém, de uma probabilidade *a posteriori*, calculada numa situação real e refere-se a um só marcador genético e a um determinado indivíduo.

A probabilidade de concordância acumulada diz respeito ao conjunto dos polimorfismos de DNA usados na resolução de um caso, representando a probabilidade de que um indivíduo, tirado ao acaso

da população, coincida para os fenótipos relativamente a todos os marcadores genéticos estudados com os fenótipos da amostra biológica (Fernández, 1999). Para n sistemas é dada pela fórmula:

$$C = p_1.p_2...p_n$$

Em que $p_1, p_2...p_n$ são as probabilidades de concordância dos sistemas 1, 2, n . (Pinheiro, 2008b).

BIBLIOGRAFIA

- Amorim, A. (2008). "A cautionary note on the evaluation of genetic evidence from uniparentally transmitted markers". *Forensic Sciences International Genetics*, 2(4): 376–378.
- Balogh, M.K., Burger J., Bender K., Schneider P.M., Alt K.W. (2003). STR genotyping an mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Sciences International*, 137, 188-195.
- Butler, J. (2005). Forensic DNA issues: degraded DNA, PCR inhibition, contamination, mixed samples and low copy number. In *Forensic DNA Typing, Second Edition* (pp. 145-179). Elsevier Academic Press.
- Butler, J. (2005). Mitochondrial DNA Analysis. In *Forensic DNA Typing, Second Edition* (pp. 241-298). Elsevier Academic Press.
- Butler, J. (2010). Forensic Challenges: Degraded DNA, Mixtures, and LCN. In *Fundamentals of Forensic DNA Typing* (pp.315–339). Elsevier.
- Butler, J. (2011). Y-Chromosome DNA Testing. In *Advanced Topics in Forensic DNA Typing Methodology* (pp.371–405). Elsevier Academic Press.
- Cainé, L., Carvalho R., Costa S., Pereira M.J., Pinheiro M.F. (2011). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3, e206–e207.
- Carracedo, A. (1999). Valoración de la Prueba del ADN. In *La Prueba del ADN en Medicina Forense: 301-308*. Masson. Barcelona.

- Coble, M.D., Butler, J.M. (2005). Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Sciences*, 50, 43–53.
- Crespillo, M., Paredes, M.R., Prieto, L., Montesino, M., Sala A., Albarran, C. ...García-Hirschfeld, J. (2006). Results of 2003-2004 GEP-ISFG collaborative study on mitochondrial DNA: focus on the mtDNA profile of a mixed semen-saliva stain. *Forensic Science International*, 160, 157-167.
- Deedrick, D.W. (2000). Hair Evidence. *Forensic Science Communications*, 2(3).
Disponível em: <http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensicsciencecommunications/fsc/july2000/deedrick.htm/deedric1.htm>
- Elliott, K., Hill, D.S., Lambert, C., Burroughes, T.R., Gill, P. (2003). Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides. *Forensic Science International*, 137, 28–36.
- Gaudette, B.D. (2000a). Hair. In Siegal J; Knupfer G & Saukko P (Eds), *Encyclopedia of Forensic Sciences* (Vol. 3, pp. 999-1002). Academic Press.
- Gaudette B.D. (2000b). Identification of Human Animal Hair. In Siegal J; Knupfer G & Saukko P (Eds), *Encyclopedia of Forensic Sciences*. (Vol. 3, pp.1034-1041). Academic Press.
- Gill, P., Jeffreys, A.J., Werrett, D.J. (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*, 318,577–579.
- Gill, P., Fereday, L., Morling, N., Schneider P.M. (2006a). New multiplexes for Europe. Amendments and clarification of strategic development. *Forensic Science International*. 163, 155–157.
- Gill P., Fereday L., Morling N., Schneider P.M. (2006b). The evolution of DNA databases— recommendations for new European STR loci. *Forensic Science International*, 156, 242– 244.
- Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007). Biological material: collection, characterization and storage. Presumptive testing. In *An Introduction to Forensic Genetics*. (pp.21–23). Wiley.
- Graham, A., Ruty, G. (2008). Investigation into “normal” background DNA on adult necks: implications for DNA profiling of manual strangulation victims. *Journal of Forensic Sciences*, 53(5), 1074–1082.
- Gusmão, L., Alves, C., Sánchez-Diz, P., Zarrabeitia, M.T., Abovich, M.A., Aragón, I. ...Amorim, A. (2008). Results of the GEP-ISFG collaborative study on an X-STR decaplex. *Forensic Science International: Genetics, Supplement Series*, 1, 677–679.
- Gusmão, L., Sánchez-Diz, P., Alves, C., Gomes, I., Zarrabeitia, M.T., Abovich, M. ...Amorim, A. (2009). A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *International Journal of Legal Medicine*, 123 (3), 227-234.
- Hall, A., Ballantyne, J. (2003). Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervicovaginal samples. *Forensic Science International*, 136, 58-72.
- Lagoa, A., Pinheiro, M.F. (2006). Impressões digitais como evidência para identificação genética. *Polícia e Justiça. Revista do Instituto Superior de Polícia Judiciária e Ciências Criminais*, 7, 253-269.
- Lareu, M.V., Barral, S., Salas A., Pestoni, C., Carracedo, A. (1998). Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D1S1656 locus. *International Journal of Legal Medicine*, 111 (5), 244–247.
- Lareu, M.V., Pestoni C., Schurenkamp, M., Rand S., Brinkmann, B., Carracedo, A. (1996). A highly variable STR at the D12S391 locus. *International Journal of Legal Medicine*, 109 (3): 134–138.
- Lowe, A., Murray, C., Richardson, P., Wivell, R., Gill, P., Tully, G., Whitaker, J. (2003). Use of low copy number DNA in forensic inference. *International Congress Series*, 1239, 799-801.
- Pinheiro, M.F., Cainé, L., Pontes, L., Abrantes, D., Lima, G., Pereira, M.J., Rezende, P. (2005). Allele frequencies os sixteen STRs in the population of North of Portugal. *Forensic Science International*, 148, 221–223.
- Pinheiro, M.F. (2008a). Agressões sexuais. In *CSI Criminal* (pp.11-40). Edições Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Pinheiro, M.F. (2008b). A Perícia em Genética e Biologia Forense – Criminalística Biológica. In *CSI Criminal* (pp.11– 40). Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Pinheiro, M.F. (2009). Identificação genética: passado, presente, futuro. *Revista do Ministério Público*, 118, 157–196.
- Pinheiro, M. (2010a). Advances in DNA typing in Sexual Assault Casework. In *Forensic Genetics Research Progress* (pp.117-132). Nova Science Publishers, Inc.
- Pinheiro, M.F. (2010b). Algumas perspetivas da identificação genética. In *Genética Forense. Perspetivas da*

- identificação genética (pp.17-78). Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Pinheiro, M.F. (2010c). Estudo de DNA não-humano. In *Genética Forense. Perspetivas da identificação genética* (pp.163-186). Edições Universidade Fernando Pessoa.
- Pinheiro, M.F. (2011). Identificação Genética no Âmbito de Crimes Sexuais. *Revista de Investigação Criminal da ASFIC*, 2, 56-84.
- Pontes, M.L., Cainé, L., Abrantes, D., Lima, G., Pinheiro, M.F. (2007). Allele frequencies and population data for 17 Y-STR loci (AmpFISTR1 Y-filer™) in a Northern Portuguese population sample. *Forensic Science International*, 170, 62–67.
- Pontes M.L., Pinheiro M.F. (2011). Population data of the AmpFISTR® NGM™ STR loci in a North of Portugal sample. *Forensic Science International: Genetics*, em publicação.
- Prieto, L. Alonso, A., Alves, C., Crespillo, M. Montesino, M., Picornelli, A. ...Salas, A. (2008). 2006 GEP-ISFG collaborative exercise on mtDNA: reflections about interpretation, artefacts, and DNA mixtures. *Forensic Science International: Genetics*, 2, 126–133.
- Sanders, C.T., Sanchez, N., Ballantyne, J., Peterson, D.A. (2006). Laser Microdissection Separation of Pure Spermatozoa from Epithelial Cells for Short Tandem Repeat Analysis. *Journal of Forensic Sciences*, 51(4): 748-757.
- Sibille, I., Duverneuil, C., Lorin de la Grandmaison, G., Guerrouache, K., Teissière, F., Durigon, M., Mazancourt, P. (2002). Y-STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa. *Forensic Science International*, 125, 212–216.
- Soares-Vieira, J. (2007). Y-STRs in Forensic Medicine: DNA Analysis in Semen Samples of Azoospermic Individuals. *Journal of Forensic Sciences*, 52 (3), 664-670.
- Sweet, D., Lorente, M., Valenzuela, A., Lorente, J.A., Alvarez, J.C. (1997). Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified chelex method. *Forensic Science International*, 83, 167–77.
- Szibor, R. (2007). The X chromosome in forensic science: past, present and future. *Molecular Forensics*, 103-126. Wiley.
- Valverde, L., Palencia, L., Pinheiro, M.F., Cainé, L., Cardoso, S., Alfonso-Sánchez M., Pancorbo M.M. (2009). Segments HVS-I and HVS-II of mitochondrial DNA in a population from Santa Catarina (Brazil): Predominance of European lineages. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2, 338–339.
- Willuweit S., Roewer L. (2007). Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 83-87.
- Zarrabeitia, M.T., Fátima Pinheiro M., de Pancorbo, M.M., Cainé, L., Cardoso, S., Gusmão, L., Riancho, J.A. (2008). Analysis of 10 X-linked tetranucleotide markers in mixed and isolated populations. *Forensic Science International: Genetics*, 3(2), 63-66.