

António Amorim

GENÉTICA FORENSE



ACADEMIA DAS CIÊNCIAS
DE LISBOA

ACADEMIA DAS CIÊNCIAS DE LISBOA

FICHA TÉCNICA

TÍTULO
GENÉTICA FORENSE

AUTOR
ANTÓNIO AMORIM

EDITOR
ACADEMIA DAS CIÊNCIAS DE LISBOA

EDIÇÃO
ANTÓNIO SANTOS TEIXEIRA
SUSANA PATRÍCIO MARQUES

ISBN
978-972-623-253-7

ORGANIZAÇÃO



ACADEMIA DAS CIÊNCIAS
DE LISBOA

Academia das Ciências de Lisboa
R. Academia das Ciências, 19
1249-122 LISBOA
Telefone: 213219730
Correio Eletrónico: geral@acad-ciencias.pt
Internet: www.acad-ciencias.pt

Copyright © Academia das Ciências de Lisboa (ACL), 2015
Proibida a reprodução, no todo ou em parte, por qualquer meio, sem autorização do Editor

GENÉTICA FORENSE

António Amorim¹

Breve nota introdutória

A genética, enquanto domínio da biologia, acolheu, nos últimos vinte anos, avanços absolutamente notáveis, sobretudo resultado do surgimento e integração dos métodos da biologia molecular. Aliás, nenhuma outra ciência e, particularmente, nenhuma ciência biológica ou biomédica, terá experimentado avanços, nas últimas décadas, como as ciências que integraram os conhecimentos e utilizam os métodos da biologia molecular. Naturalmente que a genética forense é um extraordinário e muito bem-sucedido exemplo desta constatação. Sendo, enquanto ciência, um domínio da biologia é, no entanto, uma área que, por um lado, pode receber contributos e colaborações e, por outro lado, pode integrar o leque de conhecimentos e, eventualmente, de competências de profissionais tão diversos como biólogos, criminologistas, farmacêuticos, juristas, médicos, entre outros.

À genética forense cabe, pois, o estudo de amostras biológicas ou outras, sejam amostras de referência ou amostras problema, com vista à obtenção de perfis genéticos. Será o estudo e, sobretudo, a análise comparativa dos perfis genéticos obtidos que permitirá à genética forense apoiar os tribunais na superior e douta administração da justiça.

Tentando utilizar linguagem e conceitos, perceptíveis a um público tão alargado quanto possível, desenvolveu-se o presente texto, que pretende plasmar o conteúdo da conferência alusiva ao tema “Genética Forense”, proferida no âmbito do ciclo de conferências intitulado *Crime e Violência*, promovido pelo Instituto de Estudos Para Seniores — Professor Adriano Moreira, da insigne Academia das Ciências de Lisboa.

Perfis genéticos

Um perfil genético é uma descrição ou informação relativa a um determinado local ou locais do genoma de um indivíduo. Ao local ou locais do genoma do indivíduo utilizados para, mediante o seu estudo descritivo, obter um perfil genético, habitualmente, designamos por marcador(es) genético(s).

Esta informação ou descrição pode tomar a forma de uma sequência específica de nucleótidos de um local, ou, ainda, tomar forma numérica, em que os números indicam o número de repetições de um determinado fragmento ou fragmentos existentes no genoma do indivíduo.

¹ Especialista, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses | Professor Auxiliar Convidado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa | Docente Convidado, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz | Investigador, CENCIFOR — Centro de Ciências Forenses

A título de exemplo, um perfil genético ou haplótipo de DNA mitocondrial é, habitualmente, apresentado como uma determinada sequência de nucleótidos e um perfil genético de STR autossómicos é apresentado como um conjunto de números, que não traduzem mais do que o número de repetições de cada STR existentes no genoma do indivíduo.

Desde já se subentende que quando falamos de perfil genético podemos estar a falar de diferentes tipos de perfis, tais como perfil ou haplótipo de DNA mitocondrial, perfil de STR autossómico, perfil de STR dos cromossomas X ou Y, de entre outros. Regra geral, quando falamos de perfil de DNA de um indivíduo, sem quaisquer outras alusões, estamos a falar do seu perfil de STR autossómicos.

Determinados perfis genéticos podem ser, por regra, individualizantes, isto é, podem ser exclusivos de uma pessoa, identificam uma pessoa, e, outros perfis genéticos podem ser específicos de grupos mais alargados de indivíduos. São disso exemplo os perfis genéticos específicos de uma linha paterna (perfil de STR do cromossoma Y), os perfis genéticos específicos de uma linha materna (perfil ou haplótipo de DNA mitocondrial). Portanto, estes últimos, não individualizam uma pessoa, mas ‘individualizam’ um grupo de pessoas.

É mediante a obtenção de perfis genéticos de um indivíduo ou indivíduos e de perfis genéticos obtidos a partir de amostra ou amostras problema, e, sobretudo, mediante a análise e estudo comparativo de todos os perfis, que resultará o relatório pericial de genética forense.

A definição de perfis genéticos, no âmbito da genética forense, permitirá a realização de perícias que vão desde as perícias de investigação de parentesco biológico, passando por perícias de criminalística biológica, designadamente em casos de crimes sexuais e homicídios, até às perícias de identificação de desconhecidos ou de identificação de espécie animal em remanescentes cadavéricos.

Atualmente, de acordo com as recomendações internacionais, e muito particularmente do *European DNA Profiling Group* (EDNAP), os marcadores genéticos que, no âmbito da genética forense, permitem obter perfis genéticos individualizantes são as já referidas sequências de DNA com 4 a 7 nucleótidos, de regiões microssatélite ou STR, cujas variantes ou alelos se caracterizam pelo número de repetições que apresentam (Chakraborty *et al.* 1999; Gil, 2002), ou, ainda, marcadores de nucleótido único ou sequência única, e cujas variantes ou alelos se caracterizam pela substituição, ou pela inserção ou deleção desse mesmo nucleótido único ou sequência única, habitualmente designados SNP (acrónimo de *Single Nucleotide Polymorphisms*), no caso de substituição, ou por InDel (acrónimo de *Insertion or Deletion Polymorphisms*), no caso de inserção ou deleção (Francez *et al.*, 2011; LaRue *et al.*, 2011; Manta *et al.*, 2012; Romanini *et al.*, 2011).

Contrariamente aos SNP e InDel, a utilização de STR é prática generalizada nos serviços e laboratórios dedicados à rotina de estudos forenses há já vários anos.

A quantidade e os STR utilizados para a determinação de um perfil genético individual apresentam alguma variação a nível internacional, sendo definidos localmente pelas autoridades políticas e judiciárias territorialmente competentes.

Atualmente, nos laboratórios oficiais de genética forense, em Portugal, utilizam-se os 13 STR do sistema CODIS e mais 4 STR autossómicos — D2S1338, D19S433, Penta D e Penta E — e, em casos especialmente complexos, designadamente casos em que só se verifica incompatibilidades em dois STR, estudam-se, ainda, como STR adicionais, os STR autossómicos SE33, ES, LPL, F13B, FESFPS, F13A01, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656 e D12S391 (Amorim *et al.*, 2011).

Em amostras com DNA degradado, podemos ainda estudar sequências de DNA, em parte sobreponíveis aos STR, mas com dimensões inferiores a 150 pares de bases — os designados mini-STR. Estes marcadores genéticos foram desenvolvidos através da modificação dos *primers* para amplificação dos STR, que passam a delimitar regiões interiores e, portanto, menores que as regiões definidas para os STR.

No entanto, em resultado de baixas quantidades de DNA ou DNA muito fragmentado/degradado, pode não ser possível obter um perfil de DNA com os marcadores STR ou mini-STR, e, nestes casos, a alternativa são os SNP ou os InDel.

A vantagem destes últimos, em relação aos STR, é o tamanho dos produtos de PCR, que nunca é superior a 100 pares de bases, quando comparados com os 300 a 400 pares de bases dos STR, possibilitando assim, o seu uso em material com DNA degradado.

No entanto, no caso dos SNP, são muito mais laboriosos que os STR, utilizam tecnologia diferente da utilizada nos laboratórios forenses para o estudo de STR e são menos discriminantes que os STR, visto serem necessários 45 a 50 *loci* SNP para um resultado discriminante comparável a 13 a 15 STR.

Relativamente aos InDel, são menos laboriosos que os STR, utilizam a mesma tecnologia que os STR e têm poder discriminante mais aproximado ao dos STR que os SNP, sendo portanto, em princípio, mais promissores que os SNP. A única desvantagem que ainda lhes está associada é o facto de não estarem suficientemente estudados e, especialmente, não estarem implementados nos laboratórios forenses.

Para além do estudo de STR, mini-STR, SNP e InDel autossómicos, quando não é possível obter um perfil de DNA com estes marcadores nucleares, procede-se à análise de DNA mitocondrial (Andelinovic, 2005), que não permitindo, por si só, como já referimos, uma identificação individual, pode, no entanto, ser um instrumento de grande

utilidade, na medida em que pode permitir, com segurança, através da identificação de uma linha materna, determinar situações de exclusão.

Uma das principais vantagens do DNA mitocondrial em relação ao DNA nuclear (2 cópias por célula), consiste no facto de possuir cerca de 500-2000 cópias por célula, o que aumenta as probabilidades de existirem algumas cópias, mesmo em amostras forenses muito degradadas e/ou antigas. O comprimento do DNA mitocondrial (100.000 vezes inferior ao DNA nuclear) e a sua forma circular também lhe conferem uma menor probabilidade de degradação em relação ao DNA nuclear.

Outra das características já mencionadas do DNA mitocondrial, consiste no facto de este ser herdado por via materna, ou seja, todos os indivíduos pertencentes à mesma linhagem materna possuem o mesmo DNA mitocondrial (exceto na presença de mutações). A análise de DNA mitocondrial é, assim, de grande utilidade quando várias gerações separam as vítimas dos seus descendentes vivos, como os casos de desaparecidos durante décadas, em consequência de conflitos políticos, genocídios ou guerras.

No entanto, genericamente, os marcadores haplotípicos (DNA mitocondrial e cromossoma Y) apresentam baixo poder de discriminação, em comparação com o poder de discriminação que proporcionam os marcadores autossómicos, o que leva a um menor grau de certeza na identificação final (Crespillo, 2011).

Perícias de identificação de cadáver

A Declaração Universal dos Direitos do Homem foi proclamada pela Assembleia Geral das Nações Unidas, em 1948. No seguimento da aprovação da Constituição da República Portuguesa, pela Assembleia Constituinte, em 1976, o reconhecimento e aplicação da Declaração Universal dos Direitos do Homem, por Portugal, ocorre em 1978. Esta declaração prevê, no âmbito dos direitos fundamentais do Homem, o direito, por todos os indivíduos, em todos os lugares, ao reconhecimento da sua personalidade jurídica, o que, de entre múltiplas e diversas implicações significa, também, que todo o Homem tem direito, em todos os lugares, e, em todas as situações, ao reconhecimento da sua identidade e, portanto, à sua identificação.

Contrariamente ao que se passa com a maior parte dos indivíduos vivos ou cadáveres humanos frescos não mutilados, a identificação visual pode não ter aplicação ou utilidade no caso de cadáveres mutilados, cadáveres em avançado estado de decomposição ou cadáveres esqueletizados. Nestes casos, a Genética Forense pode ser uma importante ferramenta no âmbito da identificação humana.

A identificação genética de um indivíduo desconhecido, independentemente de ser um cadáver ou ser um indivíduo vivo, é sempre um ato de natureza comparativa. A comparação poderia ser feita com o perfil genético do próprio indivíduo, caso já existisse uma base de dados de perfis de DNA para fins de identificação civil que

integrasse todos os indivíduos da população, ou, alternativamente, como acontece atualmente em Portugal, na grande maioria dos casos, a comparação é feita com perfis genéticos de parentes do suposto indivíduo. Também por este motivo, o número de perícias de identificação de cadáveres desconhecidos é pouco elevado, pois, só tem lugar quando há informação razoavelmente robusta sobre quem detenha direitos sobre o cadáver e, simultaneamente, quando existem familiares do suposto indivíduo que livre e esclarecidamente fornecem amostras biológicas suas, a utilizar como amostras para comparação.

No caso de cadáveres íntegros ou em bom estado de conservação, as amostras do cadáver utilizadas na perícia de identificação são, habitualmente, sangue ou unhas.

No caso de cadáveres praticamente esqueletizados ou no caso de remanescentes cadavéricos, as amostras do cadáver utilizadas na perícia de identificação são, caso existam, dentes ou, caso estes não existam, fragmentos ósseos, sendo os ossos longos, e em particular o fémur, os que permitem melhores resultados.

As amostras dos familiares do indivíduo a identificar, habitualmente utilizadas, são sangue ou células epiteliais da mucosa bucal.

A perícia de identificação consiste em obter o perfil genético do cadáver ou restos cadavéricos e os perfis genéticos dos familiares do suposto indivíduo para, mediante comparação, se concluir qual a probabilidade de parentesco ou, alternativamente, concluir pelo afastamento da hipótese de parentesco e, neste último caso, o cadáver continuar por identificar.

O processamento laboratorial das amostras, no âmbito das perícias de identificação de desconhecido, inicia-se pela extração de DNA. A extração de DNA de amostras de sangue ou de células da mucosa oral, podendo ser realizada recorrendo a diversos métodos, é, habitualmente, efetuada através do método conhecido como o método de Chelex (Walsh *et al.*, 1991).

Em relação à extração de DNA de amostras ósseas é necessário um processamento prévio com vista a reduzir os ossos a pó, através da utilização de azoto líquido e de um crio-triturador. No caso de ossos longos, como o fémur, terão que ser inicialmente seccionados pequenos fragmentos, os quais serão posteriormente levados ao crio-triturador dentro de uma ampola adequada. A extração de DNA a partir dos ossos reduzidos a pó é, habitualmente, realizada pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Davoren *et al.*, 2007) ou por métodos com recurso a enzimas e sílica, podendo, no entanto, ser utilizados outros métodos.

Uma vez realizada a extração de DNA, a fase seguinte é a amplificação por PCR, tendo por alvos o conjunto de 17 STR autossómicos já referidos e o gene homólogo da amelogenina, para obtenção de um perfil genético individual.

Uma vez realizada a amplificação, os produtos da mesma são detetados por eletroforese capilar num sequenciador automático.

O sequenciador permite a emissão de eletroforegramas com os resultados/alelos que o especialista, após análise e ponderação, entenda como valorizáveis, com recurso a *software* apropriado.

Na posse dos eletroforegramas, os alelos que cada indivíduo apresenta em cada STR são transcritos para uma folha de registo adequada e começa-se por verificar se existem ou não incompatibilidades entre a constituição genética do cadáver e a constituição genética dos supostos parentes. Existindo incompatibilidades em mais que dois STR é afastada a possibilidade de parentesco e, neste caso, a perícia não permite a identificação do cadáver. Não existindo incompatibilidade em nenhum STR conclui-se pela impossibilidade de exclusão de parentesco e calcula-se a probabilidade de parentesco.

O cálculo do parâmetro probabilidade de parentesco é feito através das fórmulas propostas em 1938 por Essen-Möller (Baur *et al.*, 1986). Este cálculo pode ser realizado manualmente ou através de programas informáticos, sendo um dos programas informáticos mais utilizado a nível internacional o programa FAMILIAS (Drábek *et al.*, 2009).

No final é elaborado um relatório pericial com a descrição do caso, material e métodos utilizados, resultados obtidos e conclusões.

Perícias de identificação da espécie animal

Muito embora sejam em número muito reduzido, são recebidos, por vezes remanescentes cadavéricos, quase sempre de natureza óssea ou visceral, para confirmação de que se está perante remanescentes humanos.

Em perícias de determinação da espécie animal, internacionalmente, a região do genoma mais utilizada é o gene do citocromo b (cytb) (Bravi *et al.*, 2004). A sequência de nucleótidos do gene do cytb é espécie-específica, isto é, é característica e diferente de espécie animal para espécie animal.

Sumariamente, a perícia inicia-se, também, pela extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico ou por métodos com recurso a enzimas e sílica, podendo, no entanto, ser utilizados outros métodos.

Uma vez realizada a extração de DNA, a fase seguinte é amplificação de DNA, tendo por alvo um fragmento de cerca de 350 pares de bases do gene do cytb.

Uma vez realizada a amplificação, os produtos da mesma são sequenciados e detetados por eletroforese capilar num sequenciador automático.

O sequenciador permite a emissão de eletroforegramas com a sequência alinhada e corrigida, com recurso a *software* adequado.

Na posse da sequência, a mesma é inserida na página eletrónica BLAST (acrónimo de *Basic Local Alignment Tool*), da *National Library of Medicine*, disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, obtendo-se a espécie a que correspondem os remanescentes cadavéricos estudados.

É elaborado um relatório pericial com a descrição do caso, material e métodos utilizados, resultados obtidos e conclusões.

Perícias de investigação de parentesco biológico

O regime jurídico aplicável à investigação de parentesco biológico, e muito particularmente a investigação de paternidade, encontra-se previsto no Código Civil português. O artigo 1864.º do referido código determina, relativamente à paternidade desconhecida, que sempre que seja lavrado registo de nascimento de menor apenas com a maternidade estabelecida, deve o funcionário remeter ao tribunal certidão integral do registo, a fim de se averiguar oficiosamente a identidade do pai.

Já relativamente à averiguação oficiosa da paternidade, de acordo com disposto no artigo 1865.º, sempre que possível, o tribunal ouvirá a mãe acerca da paternidade que atribui ao filho. Se a mãe indicar quem é o pai ou por outro meio chegar ao conhecimento do tribunal a identidade do pretense progenitor, será este também ouvido. No caso de o pretense progenitor confirmar a paternidade, será lavrado termo de perfilhação e remetida certidão para averbamento à repartição competente para o registo. Se o presumido pai negar ou se recusar a confirmar a paternidade, o tribunal procederá às diligências necessárias para averiguar a viabilidade da ação de investigação de paternidade. O artigo 1801.º prevê, pois, que nas ações relativas à filiação são admitidos como meios de prova os exames de sangue e quaisquer outros métodos cientificamente comprovados.

Por norma, e na maior parte dos casos de investigação de parentesco biológico, a perícia realizada pela Genética Forense, tem início com a ordem do Tribunal para a realização da mesma, à qual, de imediato, se segue indicação sobre as datas de marcação das colheitas de amostras biológicas aos intervenientes no caso. O mais frequente é serem presentes, como intervenientes, um trio constituído por um suposto pai, uma mãe e um menor, havendo, no entanto, variação quanto ao número ou qualidade dos intervenientes no caso. No entanto, adotaremos como regra a reflexão sobre as situações mais frequentes na prática pericial da genética forense.

Em Portugal, os casos de investigação de parentesco biológico podem também iniciar-se por ordem do Presidente do INMLCF, ou por ordem de outras autoridades como a Polícia Judiciária.

No dia marcado para a colheita das amostras biológicas, os intervenientes são inicialmente entrevistados para fins de identificação civil devidamente comprovada através da apresentação dos documentos oficiais habituais e, posteriormente, passam a uma sala adequada à colheita de amostras biológicas.

As amostras biológicas colhidas são, habitualmente, sangue periférico e raspado de células da mucosa bucal. A colheita de sangue é realizada tendo em atenção a idade do interveniente e outros eventuais aspetos particulares.

Devidamente rotuladas todas as amostras e registados todos os dados, as mesmas são adequadamente acondicionadas até o início do seu processamento laboratorial.

O processamento laboratorial das amostras, no âmbito das perícias de investigação de parentesco biológico, inicia-se pela extração de DNA a partir da amostra de sangue ou das células da mucosa bucal, que, podendo ser realizada recorrendo a diversos métodos, é habitualmente efetuada através do método de Chelex.

Uma vez realizada a extração de DNA, a fase seguinte é a amplificação, tendo por alvos o já referido conjunto de 17 marcadores autossómicos do tipo STR e o gene homólogo da amelogenina, para obtenção de um perfil genético individual.

Uma vez realizada a amplificação, os produtos da mesma são detetados por eletroforese capilar num sequenciador automático.

O sequenciador permite a emissão de eletroforegramas com os resultados/alelos que, após análise e ponderação, se entendam como valorizáveis, com recurso a *software* adequado.

Na posse dos eletroforegramas, os alelos que cada indivíduo apresenta em cada STR são transcritos para uma folha de registo adequada e começamos por verificar se existem ou não incompatibilidades entre a constituição genética de um dos intervenientes (habitualmente o menor) e o interveniente que no estudo pericial tem a qualidade inicial de suposto parente (habitualmente suposto pai), partindo sempre do pressuposto que o par formado pelos intervenientes mãe e menor é, naturalmente, um par com relações biológicas de parentesco verdadeiras. Existindo incompatibilidades em mais que dois STR, é afastada a possibilidade de parentesco. Não existindo incompatibilidade em nenhum STR, conclui-se pela impossibilidade de exclusão de parentesco e calcula-se a probabilidade de paternidade e o índice de paternidade.

Uma vez mais, o cálculo dos parâmetros probabilidade de paternidade e índice de paternidade é feito através das fórmulas propostas em 1938 por Essen-Möller.

Como referido anteriormente, as situações de investigação de parentesco biológico mais frequentes são casos de averiguação de paternidade, tendo como intervenientes um suposto pai/mãe/menor. Há, no entanto, embora a casuística seja reduzida, casos de averiguação de maternidade, casos de averiguação da existência de grau de parentesco como irmãos germanos, uterinos, de entre outros. Ainda nos casos de averiguação de paternidade biológica ou de outro grau de parentesco biológico, por vezes não é possível estudar o trio suposto pai/mãe/menor, mas sim supostos avós paternos, tios, de entre outras variantes.

Os cálculos e resultados apresentados para cada caso em particular são adequados à qualidade e número dos intervenientes no caso.

No final é sempre elaborado um relatório pericial com a descrição do caso, material e métodos utilizados, resultados obtidos e conclusões.

Perícias de criminalística biológica de âmbito sexual

O Código Penal português prevê, no capítulo V, os crimes contra a liberdade e a autodeterminação sexual. Os seus artigos 163.º e 164.º são dedicados a crimes contra a liberdade sexual, respetivamente coação sexual e violação, e os artigos 172.º e 174.º são dedicados aos crimes contra a autodeterminação sexual, respetivamente abuso sexual de crianças e atos sexuais com adolescentes menores de 16.

Na sua grande maioria os estudos periciais da Genética Forense iniciam-se com a receção de amostras biológicas, roupas ou vestígios da alegada vítima de crime contra a liberdade ou a autodeterminação sexual. A grande maioria das vítimas é do sexo feminino, havendo, no entanto, casos em que a vítima é do sexo masculino. Por este motivo a reflexão que se segue, relativamente a este tipo de perícias, tem por base um caso típico com uma vítima do sexo feminino e um agressor ou agressores do sexo masculino.

O material mais frequentemente recebido são zaragatoas de exsudado vaginal, zaragatoas de exsudado anal, zaragatoas de limpeza de diversas zonas da pele, lâminas com esfregaço de exsudado vaginal, lâminas com esfregaço de exsudado anal, peças de roupa da vítima (sendo cuecas a peça de roupa mais frequentemente recebida) e peças de roupa do local onde ocorreu o alegado crime (sendo lençóis a peça de roupa mais frequente). Em praticamente todas as perícias, recebem-se zaragatoas com raspado de células da mucosa bucal da alegada vítima, para serem utilizadas como amostras de referência da mesma.

O processamento laboratorial das amostras, no âmbito das perícias de investigação de criminalística biológica sexual, inicia-se com a utilização de métodos de

orientação para determinar se nas amostras biológicas colhidas à alegada vítima existe sémen ou outros vestígios biológicos, designadamente saliva ou sangue.

O método internacionalmente mais utilizado para pesquisa de sémen é a prova da fosfatase; para pesquisa de saliva é a prova da amílase; para pesquisa de sangue é a prova da peroxidase. Quanto à pesquisa de sémen ou outros vestígios biológicos, designadamente sangue ou saliva, nas peças de roupa ou outras amostras que não amostras biológicas, utilizam-se, também, como método de orientação, a irradiação das amostras com luz de onda curta, emitida pela lanterna *Crime Lite*TM, para deteção de fluorescência, que, em princípio, só é emitida por manchas de fluidos biológicos.

Sempre que num caso existam lâminas com esfregaços (vaginal, anal ou oral), recorre-se, ainda, à microscopia ótica para estudo destes esfregaços, previamente corados pela técnica de Papanicolaou modificada (Papanicolaou, 1942), com vista a determinar se nas amostras colhidas à alegada vítima existe material celular masculino — espermatozóides.

Independentemente dos resultados obtidos nos métodos de orientação ou no estudo microscópico, prossegue-se sempre com estudos para pesquisa de DNA de origem masculina, em todas as amostras recebidas, incluindo as roupas.

A extração de DNA dos vestígios retirados das zaragatoas de exsudados orgânicos e de vestígios retirados de presumíveis manchas de fluidos orgânicos encontradas nas peças de roupa é realizada pelo método de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico ou por métodos com recurso a enzimas e sílica, podendo, no entanto, ser utilizados outros métodos.

A extração de DNA das amostras de referência — raspado de células da mucosa oral — é realizada pelo método de Chelex, podendo, também, ser utilizados outros métodos.

Uma vez realizada a extração de DNA, a fase seguinte é a amplificação, recorrendo à PCR, sendo alvo da amplificação um conjunto de 16 STR localizados no cromossoma Y, para deteção de um perfil genético do cromossoma Y.

Os STR do cromossoma Y, habitualmente, estudados são o DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, GATAH4, DYS437, DYS438, DYS448.

Por vezes, é também necessário estudar STR autossómicos, para definição de um perfil que permita identificar um indivíduo em particular e não um indivíduo numa linhagem paterna. Estudam-se, então, os 17 STR autossómicos já atrás referidos.

Uma vez realizada a amplificação, os produtos da mesma são detetados por eletroforese capilar num sequenciador automático. O sequenciador permite a emissão de eletroforegramas com os resultados/alelos que, após análise e ponderação, se entenda como valorizáveis, recorrendo a *software* adequado.

Na posse dos eletroforegramas, os alelos obtidos em cada STR, que compõem um perfil genético do cromossoma Y, são transcritos para uma folha de registo adequada.

No final é elaborado um relatório com uma breve descrição do caso, material e métodos utilizados, resultados obtidos e conclusões.

Caso se tenha obtido, pelo menos, um perfil genético do cromossoma Y nas amostras da alegada vítima do sexo feminino, as conclusões do relatório farão referência expressa a este resultado, ficando a investigação pericial em aberto, a aguardar possíveis desenvolvimentos. Havendo, como sucede com alguma frequência, um ou mais indivíduos suspeitos de serem os agressores sexuais, haverá lugar a uma extensão da perícia de genética forense, incidindo agora sobre as amostras biológicas dos suspeitos.

Esta extensão da perícia tem, basicamente, por objetivo determinar o perfil genético do suspeito e proceder à sua comparação com o perfil genético obtido a partir das amostras da vítima, para concluir se são ou não coincidentes.

Nos casos em que a vítima é do sexo masculino, naturalmente que se obterá um perfil masculino nas suas amostras. Este perfil pode corresponder ao seu próprio perfil ou pode corresponder ao perfil de um elemento da sua linhagem paterna, pelo que, nestes casos, estudam-se sempre STR autossómicos, como já mencionado, para determinar se o material genético masculino encontrado é o seu ou o de um familiar da sua linhagem paterna (pai, tio, avô, de entre outros).

Perícias de criminalística biológica no âmbito de outros crimes

Os crimes de âmbito não sexual remetidos para estudo pela genética forense são em número menor que os crimes de âmbito sexual, sendo, na maior parte dos casos, crimes contra a vida — homicídio —, previstos no 131.º do Código Penal português.

De uma forma geral, e na maior parte dos casos, as perícias que são requeridas no âmbito destes crimes iniciam-se com a receção de amostras da vítima de homicídio e amostras recolhidas na cena do crime. Apesar do número de perícias desta natureza poder ser menor que o das anteriores, o número de amostras por perícia, designadamente amostras recolhidas na cena do crime, é, habitualmente, superior ao número de amostras recebidas no âmbito de qualquer outra perícia.

Os trabalhos realizados no âmbito destas perícias agrupam-se em procedimentos para estudo de amostras da vítima, procedimentos para estudo de amostras colhidas na cena do crime e elaboração do relatório pericial.

Em relação às amostras colhidas na vítima, o objetivo principal é, sempre, tentar encontrar (com exceção das amostras de referência) um perfil genético não coincidente com o seu próprio perfil. Perfil este que poderá ser do eventual agressor.

As amostras das vítimas de homicídio mais frequentemente recebidas são unhas da vítima, raspados subungueais das unhas da vítima e zaragatoas de limpeza de pele, ou zaragatoas de limpeza dentária ou gengival da vítima. Por norma, estas amostras não são estudadas com métodos de orientação, mas sim diretamente com métodos para deteção de perfis genéticos. Os perfis genéticos são definidos pela combinação de alelos para os mesmos STR já referidos.

Em relação às amostras recolhidas na cena do crime, o objetivo principal é, também, encontrar perfis genéticos da vítima (que a colocam do local do crime) e perfis genéticos diferentes do da vítima (eventuais agressores). No entanto, precedendo o recurso aos estudos moleculares, recorre-se, habitualmente, a estudos orientadores para determinar a presença e natureza de amostras biológicas nos vestígios recolhidos. A pesquisa de sémen ou outros vestígios biológicos, designadamente sangue ou saliva, é inicialmente realizada através da irradiação das amostras com luz, de onda curta, emitida pela lanterna *Crime Lite*TM, para deteção de fluorescência. Os outros métodos de orientação utilizados de seguida, para determinar a natureza de amostras biológicas em vestígios recolhidos na cena do crime, são a prova da fosfatase, a prova da amilase e a prova da peroxidase.

Relativamente aos métodos para determinação de perfis genéticos, a partir de amostras colhidas na cena do crime, são idênticos aos utilizados nas diferentes perícias anteriormente descritas.

No final é elaborado um relatório com uma breve descrição do caso, material e métodos utilizados, resultados obtidos e conclusões.

Caso se tenha obtido nas amostras da vítima, pelo menos, um perfil genético diferente do seu, as conclusões do relatório farão referência expressa a este resultado, ficando a investigação pericial em aberto, a aguardar possíveis desenvolvimentos. Havendo, como por vezes sucede, um ou mais indivíduos suspeitos de serem os agressores, haverá lugar a uma extensão da perícia de genética forense, incidindo agora sobre as amostras biológicas dos suspeitos.

Base de Dados de Perfis de DNA

A Lei n.º 5/2008, de 12 de fevereiro, aprovou a criação de uma base de dados nacional de perfis de DNA para fins de identificação civil e criminal, determinando que

o INMLCF é a entidade responsável pela mesma e pelas operações que lhe sejam aplicáveis.

O funcionamento desta base de dados de perfis de DNA rege-se pelo regulamento definido na Deliberação n.º 3191/2008, publicada em Diário da República, 2.ª série, n.º 234, de 3 de dezembro.

Uma vez determinada judicialmente a inserção do perfil genético de um indivíduo na base de dados de perfis de DNA, genericamente, a tramitação do processo vai desde a verificação da identificação civil do indivíduo, passando pela recolha das amostras biológicas, realização das análises laboratoriais para obtenção do seu perfil genético, envio do perfil genético e dados pessoais relativos ao indivíduo para a sede da Base de Dados, concluindo-se a tramitação com a inserção do perfil numa base de dados informática. Uma vez mais, os perfis genéticos são definidos pela combinação de alelos para os STR já referidos e com métodos laboratoriais idênticos.

É, pois, indiscutível a utilidade e importância de uma base de dados de perfis de DNA que contenha o mais alargado número possível de perfis/indivíduos da população (Corte-Real, 2004). Aliás, será muito simples compreender a sua utilidade e importância se tivermos presente que, caso a referida base integrasse todos os indivíduos da população, qualquer perfil genético obtido numa amostra de um local de crime ou obtido de um indivíduo, vivo ou cadáver, por comparação com a referida base de dados, seria de imediato, e em praticamente todos os casos, associado a um nome e uma identidade.

Situações de interesse histórico resolvidas pela genética forense

A Genética Forense, muito especialmente no âmbito da identificação de desconhecidos, tem assumido um papel relevante em situações de grande impacto social, humanitário e histórico. As metodologias utilizadas na rotina dos laboratórios forenses para estudo do genoma nuclear e mitocondrial têm contribuído para o esclarecimento de acontecimentos históricos, permitindo a identificação de desaparecidos em sequência de conflitos políticos, guerras, atos terroristas ou desastres de massas, como catástrofes naturais, e outros.

Pelo interesse histórico de que se reveste, começamos por fazer referência à identificação do último imperador da Rússia, Sua Majestade Imperial o Czar Nicolau II (Nikolái Alieksándrovich Románov), da sua esposa, Sua Majestade Imperial a Czarina Alexandra Feodorovna de Hesse (Vitória Alice Helena Luísa Beatriz de Hesse), de três dos seus cinco filhos, do médico e de três criados da família imperial, todos assassinados pelos bolcheviques, em Ekaterinburg, em 1918.

Quase 80 anos após a sua morte, em 1991, foi revelado o achado de ossadas humanas, em escavações, a cerca de 20 km de uma das principais cidades dos Montes Urais — Ekaterinburg —, onde a família imperial havia sido mantida prisioneira.

Através de perícias forenses concluiu-se que os esqueletos, em estado avançado de deterioração, apresentavam sinais de agressões *ante mortem* e alguns deles apresentavam mesmo orifícios no crânio. Os estudos de antropologia forense, designadamente de reconstrução facial e medicina dentária forense, indicavam que alguns restos ósseos podiam corresponder a elementos da família imperial da Rússia (Gil *et al.*, 1994).

Numa primeira fase, os estudos de genética forense, pela análise do gene da amelogenina, permitiram confirmar o diagnóstico relativo ao sexo dos cadáveres apontado pelos métodos antropológicos. Dos nove indivíduos, quatro eram do sexo masculino e cinco do sexo feminino.

A análise de ADN nuclear permitiu a obtenção de resultados em 5 STR autossómicos, os quais permitiram concluir que cinco dos cadáveres tinham relações de parentesco biológico entre si, designadamente quatro das mulheres e um homem. A análise de ADN mitocondrial permitiu inferir que as quatro mulheres poderiam corresponder a uma mãe e três das suas filhas. A sequência de ADN mitocondrial obtida foi comparada com a sequência de ADN mitocondrial do sobrinho-neto da Czarina — Sua Alteza Real o Príncipe Filipe (Duque de Edimburgo e consorte de Sua Majestade a Rainha Isabel II de Inglaterra) —, tendo-se confirmado que havia identidade. Estávamos, portanto, perante a Czarina da Rússia e três das suas filhas. O quinto indivíduo, do grupo com relações de parentesco biológico entre si, seria o pai das três filhas, portanto do último Czar da Rússia. Esta constatação foi posteriormente reforçada quando se veio a verificar identidade na heteroplasmia mitocondrial detetada no cadáver do suposto Czar da Rússia e no seu irmão, Sua Alteza o Príncipe Jorge Alieksándrovich Románov (heteroplasmia 16169).

O estudo de DNA nuclear e mitocondrial dos nove cadáveres encontrados nas escavações acima referidas permitiram confirmar que dois deles eram o Czar e a Czarina da Rússia, e três eram de filhas de ambos. Já no decurso do ano de 2007, foram encontrados restos mortais totalmente esqueletizados, que vieram a ser identificados, pela genética, como sendo os outros dois filhos da família Romanov, numa vala a 70 m do local onde os restos mortais do Czar tinham sido encontrados 30 anos antes (Coble *et al.*, 2011).

A título de exemplo de identificação de vítimas de conflitos armados, importa, desde logo, referir os militares mortos durante a II Guerra Mundial (1939–1945). Decorridos 60 anos sobre o conflito armado, diversos países europeus têm levado a cabo a identificação, pelo estudo de DNA, de restos esqueletizados sepultados em valas comuns. Têm sido utilizados marcadores diferentes, com objetivo comum. Desde STR autossómicos, mini-STR e Y-STR, na Eslovénia (Marjanovic *et al.*, 2007) e Bósnia e Herzegovina (Gojanovic *et al.*, 2007), até ao DNAmít na Finlândia (Palo *et al.*, 2007).

Também militares americanos, mortos em combate na guerra do Vietname (1959–1975), foram identificados, 24 anos pós-guerra, pelo *Armed Forces DNA Identification Laboratory* (AFDIL). Os restos esqueletizados de alguns dos membros dos serviços militares americanos foram identificados através da análise de DNAmít, por comparação com as respetivas mães (Holland *et al.*, 1993).

Na última década do século XX (1991–1999), ocorreram conflitos militares na Bósnia e Herzegovina, no Kosovo e na Croácia, em resultado dos quais milhares de vítimas foram sepultadas em valas comuns. Só na ex-Jugoslávia, como resultado dos conflitos armados da década de 90 do século passado, cerca de 40 000 pessoas foram dadas como desaparecidas, estimando-se que a maioria corresponde a corpos não identificados que permanecem em valas comuns. Em 2000, foi formalmente estabelecido um programa da *International Commission of Missing Persons* (ICMP) na tentativa de realização da identificação humana através de uma rede que envolve estruturas político-administrativas, centros de contacto de familiares de desaparecidos e laboratórios de estudo de DNA (Huffine *et al.*, 2001). Um número considerável destas vítimas, mais concretamente cerca de 2944 restos esqueletizados, de entre 3502 corpos exumados, foi identificado entre 1993 e 2005, tendo ocorrido a maior parte das identificações entre 1993 e 1999, através de métodos antropológicos. Posteriormente à identificação por métodos antropológicos, cerca de 1155 amostras ósseas foram submetidas a análise de DNA (Andelinovic *et al.*, 2005).

No caso específico da Guerra Civil Espanhola (1936–1939) e no período pós-guerra (1939–1950), estima-se que mais de 150 000 indivíduos foram assassinados e sepultados em valas comuns e cemitérios. Desde 2000, através da iniciativa de associações como a *Asociación para la Recuperación de la Memoria Histórica* (ARMH), foram localizadas diversas valas comuns, exumados os restos cadavéricos e, após identificação genética, sepultados os indivíduos junto dos locais e famílias de proveniência. Em 2004, foram exumados 46 esqueletos de uma vala comum junto a uma pequena cidade na província de Burgos. A informação relativa à localização da vala, ao número de corpos na mesma, e a lista das possíveis identidades foi obtida a partir de entrevistas realizadas pela ARMH aos familiares e testemunhas, a partir dos registos escritos, em forma de autobiografia, pelos mesmos, bem como a partir da pesquisa ao arquivo penitenciário (como é o caso de 21 homens libertados da prisão e subsequentemente desaparecidos). A pesquisa nos arquivos prisionais, militares e civis, bem como o depoimento das testemunhas permitiu obter dados individuais *ante mortem* das vítimas. A consistência entre os dados obtidos pelos testemunhos, pelos arquivos, pelo estudo arqueológico e osteológico, permitiu iniciar o estudo de DNA, partindo-se da hipótese de se tratar de um grupo fechado. Dos 46 cadáveres, foram identificados 17 pelo estudo de Y-STR e DNA mitocondrial (Rios *et al.*, 2010).

No caso dos militares portugueses mortos na Guerra Colonial Portuguesa, designadamente militares mortos na Guiné-Bissau, foram recentemente apresentados

resultados preliminares no âmbito da identificação genética de 7 cadáveres (Amorim *et al.*, 2012).

Conclusão

Finalizamos dizendo que não foi nosso objetivo produzir um texto que se constituísse como uma obra de referência, em termos tecnológicos e científicos, para geneticistas ou especialistas em genética, mas, tão só, um contributo para um grupo alargado e heterogéneo de profissionais, estudiosos ou, simplesmente, interessados nas principais temáticas da genética forense, que se apresente como um contributo de leitura acessível, claro e útil no âmbito do apoio ao exercício das atribuições e competências das mais diversas profissões ou, simplesmente, no âmbito da utilidade enquanto instrumento de informação relativo à genética forense.

(Comunicação apresentada no Instituto de Estudos Académicos para Seniores no ciclo Crime e Violência, a 4 de Dezembro de 2012)

Bibliografia

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Garland Science. New York. ISBN 0-8153-4072-9.
- Amorim A (2013) “Genética forense” in *Enfermagem Forense*. Edições LIDEL. Lisboa. No prelo.
- Amorim A, Afonso Costa H, Espinheira R, Costa R, Cunha E, Costa Santos J (2011) *Human identification with combined anthropologic and genetic tools: two case report in forensic medicine practice*. *Folia Societatis Medicinæ Legalis Slovacæ*. (1)1:11-14.
- Amorim A, Costa Santos J, Cunha E (2012) *Portuguese Colonial War (1616-1975): the role of forensic genetics on recently exhumed soldiers identification – preliminary results*. *Int J Legal Med* (126) Suppl 1:S121-S384. (doi: 10.1007/s00414-012-0711-9).
- Andelinović S, Sutlović D, Ivkosić I, Skaro V, Ivkosić A, Paić F, Rezić B, Definis-Gojanović M, Primorac D (2005) *Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves*. *Croat Med Jour*, 46:530-539.
- Baur M, Elston R, Gürtler H, Henningsen K, Hummel K, Matsumoto H, Mayr W, Moris J, Niejenhuis L, Polesky H, Salmon D, Valentin J, Walkers R, *No fallacies in the formulation of the paternity index*. *American Journal Human Genetics*. 1986. 39(4):528-536.
- Bravi C, Lirón J, Mirol P, Ripoli M, Peral-García P, Giovambattista G, *A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene*. *Legal Medicine*. 2004. 6:246-251.
- Butler J (2006) *Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing*. *Jour of Forensic Sci*. 51(2):253-265.
- Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B (1999) *The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems*. *Electrophoresis*. 2:1682-1696.
- Coble, M (2011) *The identification of the Romanovs: Can we (finally) put the controversies to rest? Investigative Genetics*, 2:20. [doi:10.1186/2041-2223-2-20].
- Corte-Real, F (2004) *Forensic DNA databases*. *Forens Scien Inter*, S143-S144.
- Crespillo M, Bañón R, Valverde J (2011) *Aprendizaje y reflexiones de la identificación de cadáveres mediante marcadores genéticos monoparentales*. *Rev Esp Med Legal*, 37(1):17-21.
- Davoren J, Vanek D, Konjhodzic R, Crews J, Huffine E, Parsons T, *Highly Effective DNA Extraction Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves*. *Croatian Medical Journal*. 2007. 48:478-485.

- Drabek, *Validation of software for calculating the likelihood ratio for parentage and kinship*. Forensic Science International: Genetics. 2009. 3:112-118.
- Francez PAC, Rodrigues EM, de Velasco AM, Dos Santos SE (2011) *Insertion-deletion polymorphisms – utilization on forensic analysis*. Int J Legal Med (doi: 10.1007/s00414-011-0588-z).
- Lewin B (2000) *Genes VII*. Oxford University Press. New York. ISBN 0-19-879277-8.
- Gil P (2002) *Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK – past, present, and future perspectives*. Biotechniques. 32: 366-372.
- Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K (1994) *Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis*. Nat Genet. 6(2):130-5.
- Gojanović MD & Sutlović D (2007) *Skeletal Remains from World War II Mass Grave: from Discovery to Identification*. Croat Med Jour, 48:520-527.
- Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, Weedn VW (1993) *Mitochondrial DNA Sequence Analysis of Human Skeletal Remains: Identification of Remains from the Vietnam War*. Journal of Forensic Sciences, 38(3):542-553.
- Huffine E, Crews J, Kennedy B, Bomberger K, Zinbo A (2001) *Mass Identification of Persons Missing from the Break-Up of the Former Yugoslavia: Structure, Function, and Role of the International Commission on Missing Persons*. Croatian Medical Journal, 42(3):271-275.
- LaRue BL, Ge J, King JL, Budowle B (2011) *A validation study of the Qiagen Investigator DIPplex kit; an INDEL-based assay for human identification*. Int J Legal Med (doi: 10.1007/s00414-012-0667-9).
- Lodish H, Berk A, Zipursky SA, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*. 4th edition. W. H. Freeman and Company. New York. ISBN 0-7167-3136-3.
- Manta F, Caiafa A, Pereira R, Silva D, Amorim A, Carvalho EF, Gusmão L (2012) *Indel markers: Genetic diversity of 38 polymorphisms in Brazilian populations and application in a paternity investigation with post mortem material*. Forensic Sci Int Genet (doi: 10.1016/j.fsigen.2011.12.008).
- Marjanović D, Durmić-Pasić A, Bakal N, Haverić S, Kalamujić B, Kovacević L, Ramić J, Pojskić N, Skaro V, Projić P, Bajrović K, Hadziselimović R, Drobnić K, Huffine E, Davoren J, Primorac D (2007) *DNA Identification of Skeletal Remains from the World War II Mass Graves Uncovered in Slovenia*. Croat Med Jour, 48:464-470.
- Palo JU, Hedman M, Söderholm N, Sajantila A (2007) *Repatriation and Identification of Finnish World War II Soldiers*. Croat Med Jour, 48:528-535.

- Papanicolaou G, *A new procedure for staining vaginal smears*. Science. 1942. 24:95(2469):438-439. [DOI:10.1126/science.95.2469.438].
- Pinheiro MF (2010) *Genética forense: perspectivas da identificação genética*. Edições Universidade Fernando Pessoa. Porto. ISBN 978-989-643-050-4.
- Rios L, Casado J, Prieto J. (2010) *Identification process in mass graves from the Spanish Civil War I*. Forensic Science Intern, 199:e27-e36.
- Romanini C, Catelli ML, Borosky A, Pereira R, Romero M, Salado Puerto M, Phillips C, Fondevila M, Freire A, Santos C, Carracedo A, Lareu MV, Gusmao L, Vullo CM (2011) *Typing short amplicon binary polymorphisms: Supplementary SNP and Indel genetic information in the analysis of highly degraded skeletal remains*. Forensic Sci Int Genet (doi: 10.1016/j.fsigen.2011.10.006).
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) *Chelex 100 as a médium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material*. Biotechniques. 10(4):506-513.