

A UTILIZAÇÃO DO DNA NA IDENTIFICAÇÃO DE PESSOAS

TAMARA ROSA REINER

Brasília-2003



Centro Universitário de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Bacharelado em Biologia

A UTILIZAÇÃO DO DNA NA IDENTIFICAÇÃO DE PESSOAS

TAMARA ROSA REINER

Monografia apresentada a Faculdade de Ciências
da Saúde do Centro Universitário de Brasília como
parte dos requisitos para a obtenção do grau de
Bacharel em Biologia

Orientador: Cláudio Henrique Cerri e Silva (FACS – UniCEUB)

Brasília-200

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	01
2 O DNA.....	03
. 1ASPÉCTOS HISTÓRICOS.....	03
2. ASPECTOS ESTRUTURAIS.....	04
3 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E SONDAS DE DNA.....	06
3.1ENZIMA DE RESTRIÇÃO.....	06
3. SONDAS DE DNA.....	06
4 TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA.....	07
5 REGIÕES HIPERVARIÁVEIS.....	09
6 TIPOS DE POLIMORFISMO.....	11
7 MÉTODOS UTILIZADOS EM ANÁLISE FORENSE.....	13
7. PCR: REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA.....	13
7. FRLP.....	15
8 NORMAS INERENTES A UTILIZAÇÃO DO DNA.....	17
9 ANÁLISE DE PATERNIDADE.....	18
10 INVESTIGAÇÃO CRIMINAL.....	21
11.VANTAGENS DO DNA SOBRE A SOROLOGIA TRADICIONAL.....	24
12 PRECISÃO DOS TESTES DE DNA.....	26
13 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
14.REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

No contexto atual, o exame de DNA é simplesmente o mais moderno teste para investigação de paternidade e, conseqüentemente para identificação de pessoas, pois examina os genes que são os componentes essenciais do material genético humano.

O DNA (ácido desoxirribonucléico) é sede de todas as informações genéticas que herdamos de nossos pais e transmitimos aos nossos filhos. É uma molécula muito longa, composta de elementos denominados bases que se arrumam e compõem os genes e que, por sua vez, formam os cromossomos. Os cromossomos estão localizados no interior do núcleo das células humanas. Os genes são os elementos responsáveis pela determinação de certos caracteres genéticos e como, por exemplo, a cor dos olhos, cor dos cabelos e assim por diante.

Uma grande curiosidade no que tange à realização desse exame é que, as pessoas interessadas (mãe, filho e suposto pai) devem comparecer ao laboratório para coleta de sangue, da saliva, da raiz do cabelo, do sêmen etc, o que exclui aquele mito de que: “o exame de DNA só pode ser feito com sangue”, pois o DNA é o componente genético básico e está presente em todas as células do nosso corpo. O teste de inclusão ou exclusão de paternidade pode ser feito com qualquer tecido que contenha DNA.

A investigação de paternidade e, conseqüentemente, a identificação de pessoas, sempre mereceu especial destaque entre especialistas, devido principalmente aos problemas na justiça, e foram usados vários métodos para a obtenção de dados que sugerissem ou reforçassem a hipótese de paternidade, mas somente neste século foi possível o estudo científico desta matéria através do descobrimento dos primeiros marcadores genéticos. A descoberta do sistema ABO por Landsteiner, 1901, foi sem dúvida o marco inicial nesse sentido. O sistema ABO juntamente com outros sistemas (Rh, Mn, Ss., Kell, Duffy, Kidd) compõe os marcadores eritrocitários e recebem esta denominação devido ao fato de ser estudado nos glóbulos vermelhos do sangue

humano. Outro marco importante foi a descoberta do sistema HLA por Dousset, 1952, que significa “Human Leucocyte Antigen” (Antígenos de Leucócitos Humanos), pois são estudados nos glóbulos brancos (leucócitos). Recentemente a descoberta de métodos para o estudo de regiões específicas do DNA por Jeffreys, 1985, fechou o conjunto de provas destinadas a determinar o vínculo genético e logo a paternidade.

Através do avanço da biologia molecular, o estudo da genética pode apoiar-se em métodos como a análise precisa do DNA. Foi-se pois, o tempo em que a identificação de pessoas era de ser considerada “fato oculto e incerto”, sempre presumido, devendo, em conseqüência, sua concepção ser permitida somente com “cautelas de rigor e provas”. A certeza científica, oferecida pelo exame de DNA, no que concerne a investigação da paternidade encontra hoje um único obstáculo: a recusa do suposto pai a entregar o material necessário a realização do teste.

Este trabalho tem como objetivo apresentar informações que permitem compreender a utilização do DNA como instrumento para a investigação forense.

2. O DNA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

O acrônimo ADN (ou DNA, na tradução) serve a designar uma molécula denominada “ácido desoxirribonucléico”, ou “molécula da vida”, a qual contém o código genético determinado pela herança cromossômica de cada indivíduo.

O conhecimento sobre a estrutura da “molécula da vida” completou cinco décadas esse ano, mas deve-se atentar para um fato bastante interessante, de que as informações sobre a hereditariedade vieram de estudos não de biólogos, e sim de químicos. Eles descobriram a existência de substância no núcleo da célula, separando-as em proteínas e moléculas, daí o termo dos ácidos nucleicos.

Um químico russo, Phoebus A T Levene (1869-1940), foi o pioneiro nesses estudos de ácidos nucleicos (RNA), e identificou alguns componentes do outro ácido nucleico. Levene e seus amigos formaram a primeira concepção de que as moléculas de proteínas armazenavam todas as informações genéticas nos cromossomos (e não o DNA). Por décadas foi pesquisado para que se achasse algum tipo de mecanismo que copiasse genes nas proteínas.

Em 1944, Oswald T. Avery e colaboradores, publicaram resultados sobre a existência do DNA. Suas conclusões partiram de estudos de um bacteriologista, que pesquisava sobre bactérias causadoras de pneumonia. Este, antes, em 1928, percebeu que havia uma substância que permitia a transmissão de características do organismo morto para o vivo, isto com as pesquisas de Avery, mostrou-se ser o DNA.

Depois disso, Chargaff, outro pesquisador, concluiu a proporção de compostos de DNA, adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T). Em 1950, Chargaff determinou a quantidade exata dessas bases no DNA, C igual a G e A igual a T. Estas descobertas foram muito importantes para os estudos de Watson e Crick, que modularam a correta estrutura do DNA.

Em 1951, Watson e Crick, começaram a pesquisar, secretamente, sobre a estrutura do DNA, e a partir de um raio-x puderam concluir que sua estrutura era formada por duas “hélices”, porém não tinham explicação teórica e química para o encaixe dos componentes do DNA, a “coluna vertebral” e as quatro bases (A, T, C, G), em forma helicoidal.

Eles então, começaram a pesquisar para a explicação dessa estrutura helicoidal, e com a ajuda do cristalógrafo, Jerry Donahue, em 1953 finalmente concluiu que “um par da A-T mantido por duas ligações de hidrogênio apresentava forma idêntica à de um par G-C mantido por três ligações de hidrogênio”.

Essa ligação a esse emparelhamento resolveu o último problema que enfrentavam, pois explicavam porque os dois tipos de pares de bases eram idênticos na forma, de modo que a estrutura da hélice dupla seria composta de ângulos e rotação uniformes. Essa foi a revelação crucial que lhes permitiu a começar a fazer os cálculos matemáticos finais e iniciar a construção de um modelo de madeira e metal. Após o término do modelo, verificou-se que todas as moléculas de DNA consistem em duas faixas espiraladas, como corrimãos de uma escada em espiral. Daí o nome que se celebrou com a descoberta de Watson-Crick: a hélice-dupla.

2.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS

O DNA está presente no núcleo das células eucarióticas, nas mitocôndrias, nos cloroplastos, e no citosol das células procarióticas. Nas células germinativas e no ovo fertilizado, dirige todo o desenvolvimento do organismo, a partir da informação contida em sua estrutura.

Na dupla hélice do DNA, descrita pela primeira vez por Watson e Crick em 1953, as cadeias da molécula se dobram em torno de um eixo comum e de modo antiparalelo, a extremidade 5' de uma cadeia é pareado com a extremidade 3' da outra cadeia. No tipo mais comum de hélice “B”, o esqueleto hidrofílico de fosfatos e pentoses fica na parte externa, enquanto que as bases hidrofóbicas, fixadas à este esqueleto, ficam no lado de dentro da estrutura, que lembra uma “escada em caracol”.

Há um PAREAMENTO DE BASES entre as fitas da molécula do DNA. Assim, temos sempre pareadas:

- Adenina com Timina → A-T
- Citosina com Guanina → C-G

As bases se mantêm pareadas por pontes de hidrogênio, 2 entre “A” e “T” e 3 entre “C” e “G”. Como pode ser observado na figura 1.

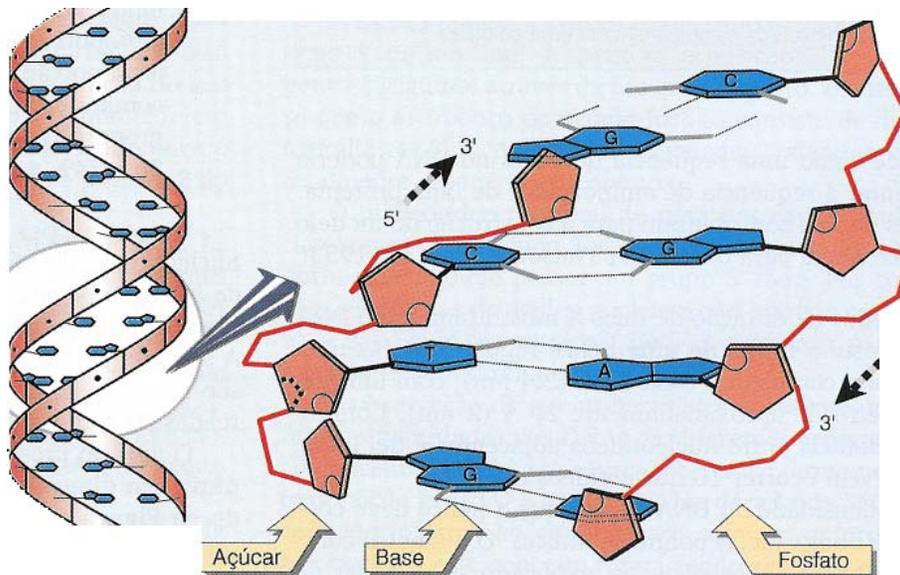


Fig. 1 – Estrutura em dupla-hélice de um pequeno segmento de DNA. Note que as fitas são antiparalelas, a direção 5' para 3' em uma fita é oposta à da outra fita. (Fonte: LEWIN, 2001)

As fitas do DNA podem ser separadas sob certas condições experimentais, sem rompimento das ligações fosfodiéster, e a dupla hélice pode ser desnaturada em um processo controlado e dependente da temperatura.

Existem três formas de DNA:

- A forma “B” → descrita por Watson e Crick , já citada anteriormente, é a forma mais comum; a hélice é voltada para a direita e com 10 resíduos por volta, com planos de bases perpendiculares ao eixo helicoidal
- A forma “A” → obtida pela desidratação moderada da forma “B”, também é voltada para a direita, mas possui 11 resíduos por volta e as bases estão em um ângulo de 20 graus em relação ao eixo helicoidal
- A forma “Z” → a hélice nesta forma é voltada para a esquerda e contém cerca de 12 resíduos por volta

A transição entre as formas de DNA pode desempenhar um papel importante na regulação da expressão genética.

3. ENZIMAS DE RESTRIÇÃO E SONDAS DE DNA

3.1 ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Enzimas de restrição podem ser pensadas como tesouras biológicas que cortam o DNA em fragmentos. Esta fragmentação, todavia, é realizada de maneira muito específica e com elevado grau de reprodutividade. Cada enzima reconhece uma determinada seqüência e corta a molécula de DNA nos locais onde esta seqüência está presente. O número e o tamanho dos pedaços de DNA assim produzidos por esta enzima específica dependem de onde estão e de quantas são as seqüências reconhecidas pela enzima, em cada pessoa.

A partir da descoberta destas enzimas, os pesquisadores puderam manipular o DNA com extrema precisão. Esta descoberta revolucionou a biologia molecular, porque possibilitou montar moléculas de DNA recombinantes.

3.2 SONDAS DE DNA

As sondas de DNA são seqüências de fita única de DNA que hibridizam, pareiam, com a seqüência de interesse, destacando-as do restante da biblioteca, que é a coleção de fragmentos de DNA obtidos a partir da ação das enzimas de restrição, ligados a vetores (molécula de DNA à qual o fragmento de DNA a ser clonado está ligado) apropriados.

Estas sondas podem ser marcadas com um isótopo radioativo, um anticorpo, uma substância fluorescente ou outro método de detecção. A utilização em conjunto das sondas e de enzimas de restrição permitiram o desenvolvimento de técnicas de detecção de DNA muito precisas, como o “Southern Blotting”, um determinado gene pode ser identificado entre milhões de fragmentos por separação eletroforética em gel com posterior identificação dos fragmentos através de sondas específicas.

As sondas de DNA são, em última análise, os elementos mais importantes para a execução técnica dos testes. São as sondas que detectam as variações nas seqüências da molécula de DNA, para que seja possível a comparação entre indivíduos.

Devido à importância das sondas de DNA e sua aplicabilidade, houve uma crescente preocupação na sua escolha e padronização, como reflexo das suas características técnicas.

São conhecidos, atualmente, dois tipos de sondas de DNA: as sondas “multi-locus” e as “**single-locus**”. Há consenso, de todas as entidades e associações científicas, das vantagens e propriedades das sondas “**single-locus**”, de tal maneira que as sondas “multi-locus” tiveram seu uso banido em Medicina Legal. As sondas “multi-locus” produzem um padrão composto por número excessivo de bandas, cuja leitura e comparação são difíceis e podem induzir a erro. Como não existe a possibilidade do cálculo de freqüências alélicas, não se pode obter o cálculo de probabilidade de paternidade, hoje unanimemente exigido pela Justiça de vários países do mundo.

4. TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA

Em 1865, o monge austríaco **Gregor Mendel** concluiu que cada característica de um indivíduo era determinada por um par de fatores hereditários. Na formação dos gametas os fatores se separavam, de modo que o gameta era portador de apenas um fator responsável por uma determinada característica. Primordialmente, as teorias de Mendel não foram bem aceitas, porém no início do século passado o que ele havia idealizado estava sendo comprovado, pois nos cromossomos das células haviam partículas responsáveis pelas características hereditárias. Consolidava-se então a **teoria cromossômica da herança**, segundo o qual os fatores hereditários, já então denominados **genes**, se distribuíam ao longo dos cromossomos. Só em 1940 foram obtidas as primeiras evidências de que a substância em que estão contidos os genes onde estão escritas as mensagens genéticas ou **código genético**. O local onde se situam os genes é chamado de **“Locus Gênico”**.

A vida humana tem origem na combinação entre os gametas (do grego *gamos* = casamento, união, fusão) masculino e feminino, ou seja, entre o espermatozóide e o óvulo. Desta fusão resulta uma célula-ovo denominada zigoto, possuidora de 46 cromossomos, 23 herdados do progenitor, 23 herdados da progenitora.

A informação biológica dos traços e características individuais que está contida nestes cromossomos é legada aos descendentes durante o fenômeno da reprodução, e a este processo de transmissão de informação genética de uma geração para a geração seguinte dá-se o nome de hereditariedade, sendo o suporte desta os genes presentes na constituição cromossômica.

O papel do DNA é primordial na transmissão dos genes, uma vez que este processo depende de sua autoduplicação, dando-se através da mitose, nos organismos que se reproduzem assexuadamente e, através da meiose, naqueles de reprodução sexuada; a meiose permite que o número de cromossomos e, conseqüentemente, dos genes, seja constante e que eles se recombinem de uma geração a outra.

Assim tem-se que os cromossomos ocorrem aos pares nas células somáticas, diplóides, pois apresentam $2n$ cromossomos, que formam cada par denominados de homólogos e apresentam o mesmo locus gênico, onde $n=23$ pares destes, isto é,

$2n=46$. Vale ressaltar que isto vale para a espécie humana, visto que cada espécie possui um número de cromossomos fixo.

Quando, nas células de um ser humano, os genes que compõem um par não são idênticos entre si, este é denominado heterozigoto para o caráter determinado pelo par de genes, que estão em heterozigose. Quando os genes alelos são idênticos, o indivíduo é denominado homozigoto para aquele caráter e estes, estão em homozigose.

Na espécie humana, cada uma das células somáticas, ao sofrer um processo de divisão chamado mitose, dará origem a duas outras células com 46 cromossomos também. A mitose é importante no crescimento dos organismos multicelulares e nos processos de regeneração de tecidos do corpo.

Já a meiose é um tipo de divisão em que uma célula dá origem a 4 novas células com a metade do número de cromossomos da célula inicial. Uma célula que apresenta $2n=46$ cromossomos, ao sofrer meiose, dará origem à 4 células com $n=23$ cromossomos, ocorrendo durante o processo de formação de gametas, em que faz referência à 1ª Lei de Mendel: “Cada caráter é determinado por fatores (genes) que se separam na formação dos gametas, indo um fator do par para cada gameta”, lei esta considerada fundamental para a Genética atual.

Por conseguinte, uma pessoa possui trilhões de células em seu corpo e todas elas, com exceção de seus gametas, são, em termos genéticos idênticas. São cópias fiéis oriundas de uma única célula $2n$ (óvulo+espermatozóide) que se multiplicou através do processo de divisão celular chamado mitose. Desta forma, um indivíduo carrega, em cada uma de suas células, as mesmas características genéticas que foram herdadas de seus pais.

5. REGIÕES HIPERVARIÁVEIS

A tipagem humana através do conhecimento da estrutura do DNA, a mais moderna metodologia aplicada mundialmente na identificação humana, tem como berço experimentos realizados há menos de 20 anos, quando em 1985, Jeffreys e

colaboradores descreveram a ocorrência no genoma humano de regiões hipervariáveis caracterizadas por apresentarem seqüências nucleotídicas repetidas “in tandem”. Estas regiões, podem ser devidas à trocas de seqüência de nucleotídeos e tem como consequência a criação ou eliminação de sítios para enzimas de restrição. Por qualquer desses processos, são gerados fragmentos alélicos de tamanho diferentes. As diferentes seqüências do DNA contendo unidades repetitivas “in tandem” se caracterizam como alelos codominantes que são transmitidos à prole de modo mendeliano.

O local onde uma destas seqüências hipervariáveis é encontrada no cromossomo é denominado loco. Cada um destes locos pode, portanto, ter várias formas diferentes, denominadas alelos. A análise de vários locos hipervariáveis permite individualizar o ser humano.

É justamente a análise dos alelos nestes locos hipervariáveis que permite a identificação pessoal precisa e a determinação de vínculo genético. O exame de DNA consiste em observar e comparar os locos hipervariáveis da criança e do suposto pai.

A variabilidade humana em termos de DNA é enorme. Dois genomas humanos escolhidos ao acaso diferem aproximadamente em cada uma de cada 500 bases do DNA (nucleotídeos). Como o genoma humano tem cerca de 3.10^9 pares de bases, isto implica em 6 milhões de diferenças entre duas pessoas (FRANÇA, 200).

Na espécie humana existem cerca de 50 mil genes que codificam, através de RNA, proteínas. Estes genes codificadores de proteínas representam, aproximadamente, 10% do genoma. Todo o restante trata-se de seqüências repetitivas que não têm função estrutural (PENA,1997).

Através de técnicas sofisticadas pode-se analisar diversas destas regiões hipervariáveis para Investigação de Paternidade e, sobretudo na Identificação de Pessoas.

Em cada exame esta comparação é feita em vários locos ao mesmo tempo, analisando diretamente a variação existente no DNA dos indivíduos estudados. O compartilhamento de alelos entre a criança e o suposto pai permite estabelecer paternidade e identificar pessoas com uma probabilidade maior, menor ou igual a

99,9999%. Por outro lado, quando os alelos não são compartilhados entre a criança e suposto pai, este é excluído categoricamente (100%) da possibilidade de ser o pai biológico da criança. Os alelos presentes no filho (a) que não estão presentes na mãe, obrigatoriamente devem estar presentes no pai biológico. O exame de DNA é, portanto, extremamente poderoso para a determinação de paternidade ou maternidade biológica. Da mesma forma, o exame é um subsídio técnico definitivo para identificar com absoluta precisão uma pessoa erroneamente apontada como pai biológico de uma criança.

A partir da descoberta das regiões hipervariáveis do DNA, as investigações genéticas têm possibilitado a resolução de disputas envolvendo direito de família e de nacionalidade. O emprego das inovações surgidas em consequência da evolução do conhecimento científico nessa área se estendeu à investigação criminal e, hoje, profissionais com profundos conhecimentos em Biologia Molecular, Genética e Estatística, expertos em identificação humana por DNA, fazem parte dos quadros técnicos-científicos de serviços relacionados com a segurança pública em diversos países.

6. TIPOS DE POLIMORFISMO

A maioria das informações genéticas presentes nas duas cópias dos diferentes indivíduos da espécie humana são idênticas, o que explica porque todas as pessoas tem as mesmas características gerais (por exemplo, o número de dedos, ou a forma geral do corpo). Entretanto, para um grande número de características genéticas, pessoas possuem cópias semelhantes, mas não idênticas da informação genética, o que explica as diferenças que existem entre as pessoas (por exemplo, a cor da pele ou a cor dos olhos). Este grupo de informações genéticas que, variam na população são chamadas de **polimorfismos** (muitas formas). Através da análise destas informações genéticas polimórficas é possível determinar as relações de vínculo genético entre examinados. Como cada cópia destas informações genéticas veio de um dos pais biológicos do indivíduo, quando se analisa as duas cópias de uma dada informação

presente em uma pessoa, e se compara estas cópias com as presentes em cada um dos seus pais, sempre se encontra no pai biológico uma das cópias presente no filho e na mãe a outra cópia do filho.

As diferenças nas moléculas de DNA, polimorfismos, servem como marcadores genéticos. Quanto mais polimórficos forem os locos analisados, maiores são as chances de que eles sejam informativos na determinação da paternidade. Quanto maior o número de locos polimórficos analisados, maior o grau de certeza obtida na análise.

Os polimorfismos das regiões hipervariáveis do DNA subdividem-se em dois tipos: polimorfismos de comprimento e polimorfismos de seqüências.

WEEDN & SWARNEN (1998), definem os polimorfismos de seqüência, como compostos de diferentes nucleotídeos em uma determinada localização do genoma, que podem ser manifestadas como regiões de alelos alternativos ou substituições, adições ou deleções de bases.

Segundo BUDOWLE (1996), os polimorfismos de comprimento são seqüências de nucleotídeos que se repetem, sendo chamadas VNTRs (variable number of tandem repeats) ou número variável de repetições consecutivas.

Vale ressaltar que existem ainda as regiões com repetições de seqüência básica maiores que 8 pares de bases (bp), **minissatélites** ou regiões em tandem longas (LTRs).

Os minissatélites são formados por seqüências de vários nucleotídeos, por exemplo, (ATGCGAGCTACTGAGCC) n , repetidas em números diferentes em cada indivíduo, dando-lhe uma característica única. Um locus de minissatélite pode ter muitos alelos em função do número de vezes (n) em que esta estrutura é repetida ao longo do DNA, deixando a população polimórfica em relação ao locus (JOBIM *et al*, 1999; JEFFREYS *et al*, 1985).

O *loci* de microssatélites (STRs) ou repetições curtas consecutivas se assemelham aos minissatélites, porém com estrutura repetida menor, como, por exemplo, na seqüência (GATA) n (JOBIM *et al* 1999).

7. MÉTODOS UTILIZADOS EM ANÁLISE FORENSE

Existem basicamente duas técnicas para identificação pessoal por análise em DNA:

1. PCR (“Polymerase Chain Reaction”)
2. RFLP (“Restriction Fragment Polymorphism”)

As duas metodologias possuem princípios distintos e requerem diferentes quantidades de material genético; entretanto, associadas, fornecem uma maior confiabilidade, precisão e poder de discriminação individual no processo de identificação por análise genética, sendo fornecido perfis de bandas indivíduo-específico.

7.1 PCR: REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA

PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática “in vitro” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR se baseia no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes “primers” são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específica da região alvo.

Sua metodologia baseia-se na utilização dessas seqüências “primers” para amplificação de regiões pré-selecionadas, necessitando de menores quantidades de

DNA, nanogramas ou picogramas de material genético. Pode-se obter o padrão de DNA de um único bulbo capilar, de uma única célula, de uma amostra com DNA altamente degradado ou material contaminado.

Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92 a 95⁰C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60⁰C, dependendo essencialmente do tamanho da seqüência do “primer” utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada “primer” com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72⁰C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3’ dos “primers”. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo (Fig. 2). Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo. (MIRANDA, 2000)

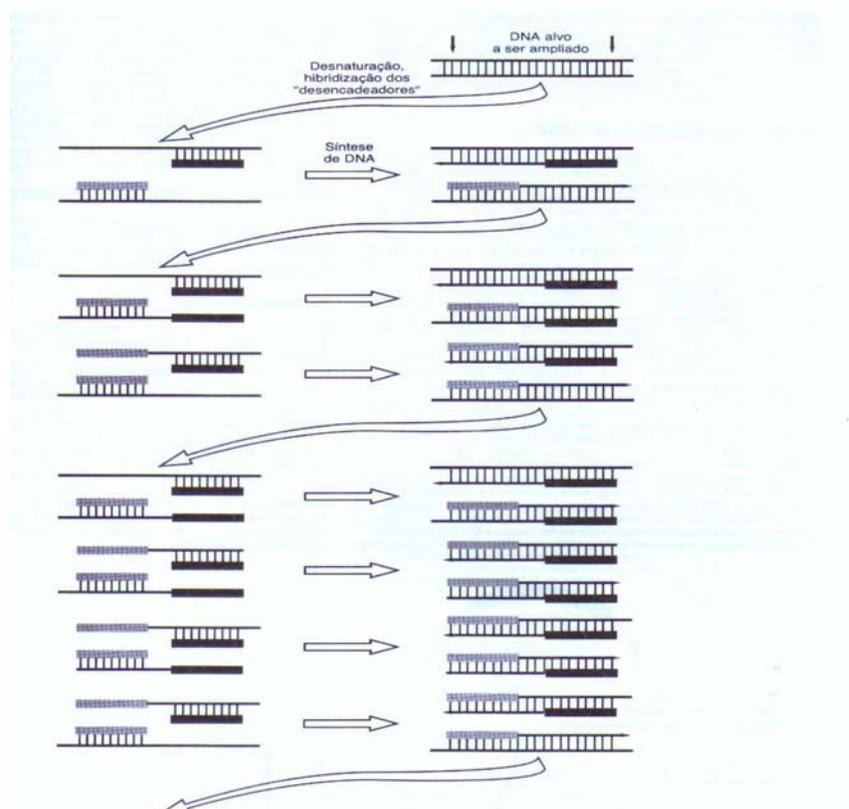


Fig. 2- Etapas principais da técnica de PCR. (Fonte: AMAR, 1991)

Todo o procedimento é realizado em aparelhos denominados termocicladores, que possuem blocos programados para aquecer e esfriar sucessivamente. A detecção dos fragmentos de DNA amplificados por PCR é realizada através de duas formas: a) pela eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida; b) pela hibridização com sonda complementar a uma região interna de produto amplificado. A hibridização pode ser realizada em membranas de náilon.

7.2 RFLP: POLIMORFISMO NO COMPRIMENTO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

Este método baseia-se na identificação de padrões genéticos, após a obtenção de fragmentos de DNA por tratamento com enzimas de restrição, e necessita de maiores quantidades de material. O resultado obtido por essa técnica corresponde a bandas de diferentes tamanhos, constituindo um padrão único para cada indivíduo utilizando sondas (conceito já explicado anteriormente).

Por esta metodologia pode-se, com uma única extração de DNA digerir o material obtido com várias enzimas de restrição e submetê-lo a um único gel de separação eletroforética.

Ao ser submetido à clivagem com uma enzima de restrição, o DNA de indivíduos geneticamente distintos é cortado nos sítios de restrição, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Os fragmentos de DNA da dupla fita são visualizados por coloração com brometo de etídio, desnaturados “in situ” com hidróxido de sódio e transferidos para uma membrana de náilon por capilaridade, com auxílio de uma solução de alta concentração salina. Tais condições permitem

que o DNA seja retido na membrana no ponto de contato entre o gel e a membrana, criando portanto uma réplica do gel. O DNA é covalentemente ligado à membrana usando-se calor ou ultravioleta. Sondas de ácidos nucléicos (marcados radioativamente) podem ser utilizadas para hibridizar com o DNA fixado na membrana. Assim, somente os fragmentos fixados na membrana que são homólogo ao DNA da sonda serão visualizados entre os milhares de fragmentos resultante do corte com enzima de restrição. Isso porque após a hibridização com as sondas, a membrana é exposta a um filme de raio x em um processo chamado autoradiografia (fig.3), revelando bandas que constituem os marcadores RFLP. Essas bandas são produzidas como resultado da sensibilização do filme pela emissão de partículas beta do fósforo radioativo, ou fótons de luz. Se os dois indivíduos diferem entre si em relação à posição do sítio de restrição enzimática na fita de DNA, gerando fragmentos de tamanho distinto, a banda será observada em posições diferentes na autoradiografia. (MIRANDA, 2000).

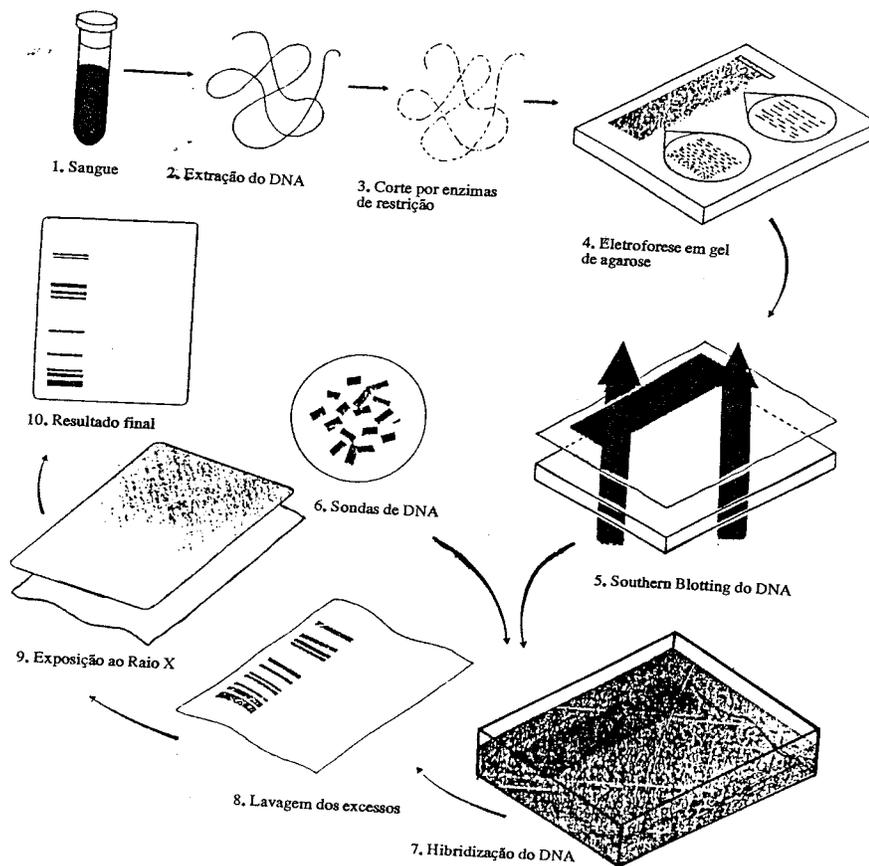


Fig.3 – Resumo das técnicas utilizadas em laboratórios de DNA forense. (Fonte: AMAR, 1991)

8. NORMAS INERENTES A UTILIZAÇÃO DO DNA

Os laboratórios de análise forense de DNA devem estabelecer certos procedimentos e indicações para assegurar que os resultados apresentados aos tribunais sejam válidos e exatos em todas as instâncias. O laboratório deve assegurar a custódia das alíquotas das amostras, garantir que os testes sejam realizados de modo próprio, com reagentes apropriados, por profissionais qualificados e que os resultados sejam interpretados por indivíduos experientes (CASKEY *et al*, 1989).

Existem organismos nacionais e internacionais responsáveis indiretamente pelo controle de qualidade das análises forenses de DNA. Estes formulam recomendações não somente para a correta execução de todos os procedimentos necessários para a análise de DNA, como também para a confecção de laudos e relatórios. Partindo deste controle de qualidade, praticam a aferição externa dos laboratórios a elas filiados através de testes de proficiência ou acreditação. Assim, estimulam a padronização de metodologias de análise e dos “loci” utilizados. Praticam ainda testes de validação para empresas fabricantes de reagentes utilizados na análise forense de DNA.

Dentre os organismos internacionais podemos citar a européia Sociedade Internacional de Hemogenética Forense (ISFH); SWGDAM – Grupo Técnico de Trabalho em Métodos de Análise de DNA, norte-americano coordenado pelo FBI; AABB – Associação Americana de Bancos de Sangue e o GITAD – Grupo Ibero-Americano de Trabalho em DNA.

A Sociedade Brasileira de Medicina Legal (SBML) editou recentemente algumas recomendações para laboratórios que realizam testes de paternidade e de identificação de pessoas através de DNA. Trata-se de uma tentativa de normatização de adesão voluntária e opcional. Formou-se também um Comitê Técnico Especializado de Biologia Molecular (CTLE 04) do INMETRO para o estudo de parâmetros de sistematização voltado para a análise de DNA.

O questionamento às provas de DNA será fatalmente praticado se não forem seguidos na análise e na elaboração do laudo os procedimentos sugeridos por estes organismos controladores de qualidade e de fomento à pesquisa. Deste modo, para que o poder das provas baseadas em análises de DNA não se esmaieça no exercício do contraditório, pela formulação direta ou indireta de questões sobre a análise realizada, devem os analistas de DNA se resguardar de cuidados técnicos na realização do mesmo e, principalmente, na construção do laudo pericial, pois será através dele que aparecerá todo o esforço por eles empreendido na elaboração da prova.

9. ANÁLISE DE PATERNIDADE

A análise para determinação de paternidade fundamenta-se em um princípio básico: a estrutura genética de um indivíduo é constituída de pares de cromossomos, onde uma unidade do par é proveniente de herança paterna e a outra, de herança materna.

Durante muitos anos, os estudos de vínculo genético restringiram-se à identificação de proteínas sanguíneas, através de detecção imunológica e de eletroforese em gel. A utilização destes marcadores protéicos fornece um resultado limitado devido, dentre outros fatores; ao baixo polimorfismo encontrado (por exemplo, o sistema ABO apresenta apenas 4 diferentes fenótipos-O, A, B e AB-; o sistema Rh, numa consideração primária, tão somente dois - positivo ou negativo), à sua instabilidade em relação a eventuais condições ambientais (sofrem desnaturação irreversível) e à sua tecido-especificidade (localizando-se em alguns tecidos ou fluídos biológicos), ocasionando assim valores estatísticos não concludentes.

Atualmente, com o advento da tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento da Biologia Molecular, pode-se realizar estudos com a própria molécula do DNA, observando-se diferenças na seqüência de bases de certas regiões do genoma. A partir destes marcadores na molécula de DNA é possível a verificação de uma maior variabilidade dentro da mesma população, pela análise, inclusive, de diferentes tipos de amostras (tecidos biológicos, fios de cabelo, ossos, dentes etc).

Em casos de exclusão, pode ser demonstrada a inexistência de vínculo genético pela presença de vários “no-matches”(não-coincidências) entre os padrões de “bandas”. Quando observamos a ocorrência de diversas coincidências, para os marcadores genéticos utilizados, nos perfis de DNA das pessoas analisadas, conclui-se por inclusão (a figura 4 pode facilitar a compreensão) ; os conjuntos das fórmulas



matemáticas empregadas deverá então fornecer os respectivos percentuais de verossimilhança entre um indivíduo (criança, jovem, filho(a) etc) com seu suposto pai (em casos de determinação de paternidade) para a população considerada.

Fig. 4 – Representa dois diagramas, um de exclusão e outro de inclusão, sendo M= mãe, C= Criança e AF= Suposto pai.(Fonte: Amar, 1991).

É obrigatório mencionar que a localização de cada fragmento de DNA no gel (produzido por revelação ou por amplificação, através da técnica de RFLP ou de PCR) depende, entre outras variáveis, do tamanho do fragmento e/ou de sua seqüência de bases específica. Cumpre assinalar que alguns fragmentos obtidos por emprego de um certo marcador genético podem constituir-se em alelos de baixa freqüência numa dada população ou “cama da étnica”. Sendo assim, os valores

estatísticos relacionados à ocorrência de certos padrões de bandas podem ser menores (ou maiores) que outros, demonstrando a existência de alelos mais raros até alelos mais frequentes numa comunidade analisada. É importante perceber que o índice de frequência alélica para cada perfil genético obtido é o fator que pode aumentar (ou diminuir) a probabilidade da coincidência (“match”) entre as bandas de DNA produzidas não ser ao acaso, por exemplo, de um suspeito e de uma amostra coletada no local do crime (ou de uma criança e de um suposto pai).

Para a inclusão de suposto pai como pai biológico, a análise estatística dos padrões genéticos obtidos permite uma dada frequência de ocorrência deste fenômeno na população. Os procedimentos experimentais empregados para relacionar-se as “bandas” do filho(a) não presentes no perfil materno como comuns (coincidentes) ao padrão genético do suposto pai, para um dado marcador, é denominado Índice de Paternidade. Este índice indica a probabilidade de um indivíduo questionado ser o pai biológico da criança em comparação com qualquer outro indivíduo aleatoriamente escolhido na população. Devido ao fato de, no conjunto dos exames, utilizar-se mais de um marcador, é necessária a associação dos diversos valores dos Índices de Paternidade, o que resultará no Índice de Paternidade Combinado (produto dos índices de Paternidade).

Finalmente, pode ser obtida a Probabilidade de Paternidade, a qual indicará a probabilidade de inclusão de um suposto pai como pai biológico. Complementarmente, calcula-se a Probabilidade de Exclusão, a qual fornecerá a probabilidade de não se encontrar outro indivíduo na população que possa apresentar perfil de “bandas” compatíveis ao encontrado na criança”.

De acordo com a **AABB** (*American Association of Blood Banks*) deve-se considerar na análise do resultado de investigação de paternidade três principais índices:

1. **Índice de paternidade:** refere-se à razão entre a probabilidade do suposto pai ser considerado pai biológico sobre a probabilidade de qualquer indivíduo, não relacionado e escolhido ao caso na população, ser considerado o pai biológico da mesma. Ou seja, quantas vezes é mais

provável a paternidade do suposto pai em relação a de qualquer outro indivíduo (já mencionada anteriormente).

2. **Índice de paternidade combinado:** refere-se ao produto dos diferentes índices de paternidade isolados encontrados para cada loco após o estudo completo do suposto pai. O FBI preconiza a utilização de, pelo menos, 4 sondas unilocais para que possa considerar, ou seja, incluir, o suposto pai como biológico. A exclusão de paternidade pode ser considerada quando o índice de paternidade for igual a zero.
3. **Probabilidade de paternidade:** expressa o grau de certeza referente à inclusão de paternidade calculado a partir da aplicação do *Teorema de Bayes*, onde se considera a chance do pai biológico ser responsável pela transmissão de determinado fragmento de restrição relacionado a uma região de DNA repetitivo para seu filho. Uma probabilidade maior que 99,99% significa confiabilidade absoluta na inclusão de paternidade

10. INVESTIGAÇÃO CRIMINAL

Pela primeira vez na História, em agosto de 1986, o material genético coletado e relacionado a local de crime (estupro seguido de homicídio) foi empregado na determinação da autoria da prática de ato delituoso- o caso Leicester (Inglaterra), sendo que neste os perfis genéticos foram aceitos em uma Corte de Justiça como evidência. Envolveu a identificação do causador de dois crimes hediondos-estupros seguidos de mortes-a partir do sêmen coletado nas vítimas e sangue do suspeito. Os crimes ocorreram em dois vilarejos do condado de Leicester, na Inglaterra. (MIRANDA, 2000)

Fato que, só foi possível pela implementação, por Alec Jeffreys, da técnica de “impressões digitais de DNA” (DNA fingerprinting). Em novembro de 1987, testes de DNA forense foram, pela primeira vez nos EUA, usados para obter a condição de culpabilidade criminal, no caso Estado da Flórida X Tommie Lee Andrews, em que foi identificado o agente de 20 invasões de residências seguidas de estupro.

Desde então, a pesquisa de material genético forense tem se desenvolvido exponencialmente, com comunidades e agências de execução penal e de ciências forenses incorporando a tecnologia do DNA para obtenção de perfis genéticos como a mais importante e poderosa ferramenta moderna contra os crimes violentos e sexo-relacionados deste final de século. Em 1990, a Agência de Estabelecimento de Tecnologia (OTA, em inglês) do Congresso norte-americano confeccionou o documento Testemunha Genética: Usos Forenses de Testes de DNA, um estudo que contém os resultados de pesquisas similares desenvolvidas pelos principais laboratórios do país, relacionadas ao tema “impressões digitais” de material genético. (MIRANDA, 2000)

A impressão digital genética do DNA permite relacionar material biológico encontrado em dado local de crime com amostras obtidas dos próprios suspeitos. O teste contribui, também, para excluir falsas acusações bem como apontar o autor de um delito durante, ainda, a fase de investigação. Além de seu valor probatório, que permanece **ad perpetuam rei memoriam** nos autos do processo, possibilita identificar vítimas nos casos em que nenhuma outra forma de fazê-lo é possível, como, por exemplo, os casos de carbonização parcial ou quase total, grandes mutilações etc.

A análise dos padrões de DNA, em investigação criminal é, basicamente, uma técnica comparativa. O padrão de DNA preparado a partir de amostra colhida no local do crime é comparado com o elaborado a partir de amostras do (s) próprio (s) suspeito (s). Se os padrões se identificarem exatamente, não restarão dúvidas que o suspeito deixou seu material biológico no local do crime.

Com o avanço da ciência e tecnologia, formou-se uma tendência de valorizar a evidência física somente sob o ponto de vista dos resultados dos exames realizados nos laboratórios. Entretanto, o que não pode ser esquecido é que o laboratório não pode analisar um vestígio incorretamente manuseado e até que este seja reconhecido e coletado durante o levantamento do local. O processo de valorização da evidência inicia-se com a pessoa que a encontra e conduz para exames laboratoriais.

Uma grande atenção dada pela comunidade judiciária está diretamente relacionada com o levantamento de locais de crime a partir de ponto da coleta do vestígio. A elucidação das evidências materiais, como último objetivo do levantamento, é necessariamente o mais importante estágio de toda a investigação.

É importante ressaltar que a qualidade do resultado de uma análise de DNA em vestígios coletados de locais de crime dependerá do tipo, da integridade e da preservação da amostra considerada. Assim a técnica usada na coleta e documentação da evidência, a sua natureza e quantidade, assim como o seu acondicionamento e preservação são alguns dos pontos críticos para um programa de execução do exame de material genético. A menos que o vestígio seja devidamente preservado no local, coletado, documentado, acondicionado e encaminhado para exame, ela não encontrará os requisitos legais e científicos mínimos para sua aceitação como meio de prova. (MIRANDA, 2000)

A identificação genética do DNA pode ser aplicada a numerosas áreas da investigação criminal. Isto pode ser obtido mesmo quando o esperma encontra-se com sangue ou outros fluidos da vítima: em homicídios, pequenos fragmentos de tecidos do autor, se disponíveis, podem ser analisados, por comparação, com o DNA (s) do (s) suspeito (s). Havendo um arquivo, ou seja, desde que se colha material com anterioridade (ou, desde que haja material de comparação de parentes próximos), identidade das vítimas de catástrofes, incêndio e outros similares, ainda é possível, quando as técnicas convencionais já esgotaram seus recursos. Pequenos pedaços de osso ou tecido podem ser suficientes para a obtenção do padrão de DNA.

Lawton e Churton, da Divisão de Química de Auckland, Nova Zelândia, estudaram outras fontes de DNA, diversas das habitualmente utilizadas, como, por exemplo, sangue e sêmen. Verificaram, entre outros, que a polpa dentária e a medula óssea são as mais promissoras e estáveis, principalmente nos casos em que nenhuma outra fonte é disponível, como por exemplo, nas grandes catástrofes e carbonizações intensas. Importante ressaltar que, segundo os autores, a polpa dentária é depósito importante de DNA, incluindo-se situações em que o organismo é submetido a duras intempéries e/ou outras condições ambientais extremamente desfavoráveis. A

estabilidade do DNA é a tônica da publicação dos autores assinalados, demonstrada no curso de suas experiências.

Por sua vez, Swarner e Reynolds, da Universidade da Califórnia, examinaram amostras de diferentes tecidos retirados de cadáveres em diverso estágios de putrefação, sangue, músculo cardíaco, fígado, baço, cabelo e osso foram obtidos de 20 cadáveres e processados segundo a técnica descrita por Jeffreys. As amostras apresentaram diferentes comportamentos, variando desde a ligeira degradação do DNA até a total deterioração. O fígado apresentou maior dificuldade para a determinação, ao passo que o músculo cardíaco e baço foram os que apresentaram maior degradação.

Assim, podemos utilizar-se do DNA nas mais diversas situações figuradas:

1. investigação criminal, em particular crimes violentos, como, por exemplo, homicídios, atentados sexuais e crime continuado;
2. identificação de restos de origem desconhecida;
3. determinação da paternidade e da maternidade;
4. violação de direitos humanos, seqüestros, detenções ilegais;
5. casos de imigração;
6. crianças perdidas ou trocadas;
7. acidentes com numerosas vítimas (queda de aeronaves, colisões múltiplas, guerra etc).

11. VANTAGENS DO DNA SOBRE A SOROLOGIA TRADICIONAL

No aspecto forense, a caracterização do material biológico tem por objetivo limitar ou reduzir o número de indivíduos que poderiam ser a fonte do material. A população sob suspeita algumas vezes é limitada ou muito próxima, permitindo assim a resolução mesmo com marcadores genéticos de baixo poder discriminatório. Contudo, nos casos em que a população não é limitada pelas circunstâncias do caso, os métodos de maior poder discriminatório tornam-se recursos importantes. A sorologia convencional (sistemas ABO, Rh, MN, PGM, HLA, entre outros) pode

rotineiramente gerar números de apenas um em dois ou um em alguns milhares. Com o estudo do DNA, o poder discriminatório pode atingir o limite necessário para inferir a identificação (FRANÇA,2001).

Várias vantagens do DNA sobre a sorologia tradicional foram descritas por WEEDN & SWARNEN (1998). A primeira e principal delas reside na possibilidade de sua aplicação sobre toda e qualquer fonte de material biológico. Uma ampla variedade de líquidos corporais é encontrada nos exames de evidência; todavia um exame sorológico completo pode ser realizado somente no sangue e não em outros tecidos ou líquidos corporais. Entretanto, com estudos de DNA qualquer quantidade traço de qualquer material biológico, incluindo o sangue, cabelos, saliva, sêmen, tecido, urina ou qualquer outro fluido biológico, pode ser analisada para associar um suspeito ao crime.

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

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

A quarta vantagem do DNA é sua resistência aos fatores ambientais. O DNA é uma molécula robusta, relativamente resistente aos ácidos, álcalis e detergentes, diferentemente dos determinantes protéicos, lipídicos e carboidratos. As proteínas podem ser desnaturadas de forma relativamente mais fácil e sua estrutura terciária conformacional, que é importante na tipagem, é facilmente desnaturável. A informação da tipagem do DNA, por sua vez, é encontrada na seqüência nucleotídica, que independe da conformação da molécula. Conseqüentemente, os exames com

DNA, diferentemente dos marcadores sorológicos tradicionais, podem ser realizados com maior segurança em amostras muito antigas e que estiveram expostas a maiores agressões ambientais.

Finalmente, a quinta vantagem do DNA reside na possibilidade de se separar o DNA da célula espermática de qualquer outro DNA celular. Um dos problemas históricos nos casos de evidência de violência sexual é a presença, quase que exclusivamente, de uma mistura de sêmen e outro líquido corporal, o que representa um problema sério para os exames sorológicos tradicionais de tipagem, pois em aproximadamente dois terços dos casos, não há possibilidade de se identificar o sêmen do doador pelo fato de a mistura dos fluidos biológicos resultar em uma mistura de tipos sorológicos (AMAR,1991). Todavia o DNA do esperma pode ser separado do DNA não-espermático por lise diferencial, o que permite a individualização da fonte do sêmen, sem que se confunda com os dados de evidências do não-sêmen.

12. PRECISÃO DOS TESTES DE DNA

Os testes de paternidade podem provar com quase 100% de certeza que um indivíduo não é o pai biológico da criança. Por outro lado, não existe nenhum teste disponível que prove com 100% de certeza que um indivíduo seja o pai biológico da criança. Esses testes podem conferir um grau de confiança de paternidade de até 99,99%, para os casos onde a amostra de DNA da mãe, filho e suposto pai é analisada. Quando falta um dos genitores, como no caso de amostras somente do filho e do suposto pai ou do filho e da suposta mãe, a precisão do teste pode ser igual ou pouco superior a 99%.

As seguintes situações podem resultar uma menor precisão dos testes:

- Casamento interraciais, ou de populações não padronizadas. Nesses casos, os laboratórios são obrigados a utilizar tabelas genéricas ao invés de específicas para as populações em análise.

· Pai biológico é parente do suposto pai. Esses casos são mais graves quando o grau de parentesco é de primeiro grau ou impossíveis de ser definidos se são irmãos gêmeos idênticos.

Deste modo, o DNA é defendido como principal ou até mesmo único instrumento probatório idôneo na sustentação da decisão judicial. Dentro dessa ótica, sem a realização da perícia, careceria o julgador de um elemento de convicção indispensável para prolação da decisão final. A prova genética é apontada como solução definitiva na verificação da paternidade. Aponta Madaleno (1999) que o DNA “tornou-se para o consenso jurídico uma nova tão clara e conclusiva prova, que sequer aceitam os Juízes progredir na instrução tradicional de uma ação de investigação de paternidade sem antes promover todos os esforços dirigidos para a efetivação da perícia genética”.

São diversos os autores que atribuem ao DNA o caráter de prova absoluta. Simas (1998) afirma que o exame “consegue sem margem alguma de erro, determinar a paternidade”. Para Rizzardo (1994), trata-se de um “método que fornece cem por cento de certeza”. Já Welter (1998) analisa que a prova na investigação da paternidade há de ser robusta, plenária e convincente, expungindo qualquer dúvida, sendo que apenas o DNA pode atender a tais exigências. Raskin (1999) elege o DNA como a “melhor prova para o esclarecimento definitivo de paternidades nebulosas”. Para Leite (1999), a perícia genética “revelou a possibilidade de se estabelecer a relação paterno-filial sem qualquer margem de erro”. Indo mais além, Amar (1991) defende que após o advento do DNA “os métodos de identificação empregados até hoje não têm mais razão de prosseguir”, e ainda, que “a investigação de paternidade pelos métodos ainda em vigor é até ofensiva diante do que representa a identificação pelo DNA”.

Vale ressaltar, a defesa da posição de que a perícia de determinação de paternidade é inalienavelmente um ato médico, alicerçado em capacitação técnica, mas igualmente em uma capacitação ética. A atuação desavisada de profissionais inadequadamente formados nos aspectos éticos e médico-legais pode levar a resultados desastrosos. A prática da determinação de paternidade deve espelhar a

medicina como um todo e pautar rigidamente o seu trabalho de acordo com cinco princípios éticos fundamentais: autonomia, privacidade, justiça, igualdade e qualidade. (CHAMELETE, 2002)

De acordo com o princípio da autonomia, os testes de paternidade deverão ser estritamente voluntários e a informação resultante deles deve ser absolutamente pessoal. Seguindo o princípio da privacidade, os resultados dos testes genéticos de paternidade de um indivíduo ou de identificação de um indivíduo não poderão ser comunicados a nenhuma outra pessoa sem seu conhecimento expresso. O princípio da justiça garante que o perito se manterá absolutamente imparcial na avaliação científica dos resultados dos exames de DNA por ele realizados, independente da identidade das pessoas envolvidas. O princípio da igualdade rege que todas as perícias serão tratadas com igual seriedade, sem qualquer consideração de classe socioeconômica, origem geográfica, raça e religião. Finalmente, o princípio da qualidade deve assegurar que todos os testes de DNA serão feitos com a tecnologia mais moderna disponível e que os laudos oferecidos terão confiabilidade absoluta. (CHAMELETE, 200).

13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos 10 anos os métodos, aplicações, popularidade e estigma social dos testes de paternidade e, sobretudo sua utilização na identificação de pessoas, mudaram drasticamente. A utilização do **PCR** nestes testes marcou um início de uma nova era. O processo de amplificação do DNA, propicia a execução do teste com pequenas quantidades de células. Mas a maior vantagem do método, são os altíssimos graus de inclusão e de exclusão alcançados.

Considerando que a análise de DNA é uma técnica poderosa de identificação, ela deve ser utilizada de forma extremamente criteriosa. O nível de sensibilidade de alguns dos procedimentos de identificação por DNA é tão alto que as células das mãos dos laboratoristas ou aquelas presentes em um simples espirro pode contaminar a amostra.

Desta forma, o cuidado na coleta, custódia e manipulação da amostra são determinantes para a validade das análises. Finalmente, o ser humano é passível de erro. Laboratoristas podem rotular erroneamente um frasco, trocar códigos ou nomes... Em razão desses possíveis erros, é que muitos laboratórios trabalham com procedimentos de dupla leitura em cada etapa da análise e de preservação de partes da amostra para eventuais reanálises. Mesmo assim, continuarão a acontecer enganos e compete ao advogado bem qualificado questionar e criticar resultados inesperados.

Finalmente, alguns cientistas acreditam que, no futuro, o perfil de DNA fará parte da identificação pessoal de forma tão natural que ele será parte integrante das carteiras de identidades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAR, A. M.; AMAR, M. J. A. **Investigação de paternidade e maternidade – aplicações médicos legais do DNA**. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1991.
- BUDOWLE, B. **Curso prático de DNA forense**. Academia de Polícia Civil do Distrito Federa - APC/DF. Brasília, Associação Brasileira de Criminalística – ABC, 26-29/06 de 1996.
- CASKEY, C. T; EDWARDS, A; HAMMOND, H. A. DNA: the history and future use n forensic analysis. In: **Proceedings of the internacional symposium on the forensic aspects of DNA analysis**. Quantico, VA, FBI Forensic Science Research and Training Center,1989.
- CHAMELETE, A. N. **Investigação de Paternidade & DNA**. Curitiba: Juruá, 2002.
- FRANÇA, G. V. **Medicina Legal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan, 2001.
- GRIFFITS, A.J. F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **An introdution to genetic analisys**. 7. ed. New York, W.H.Freeman, 2000.p.365-402;435-462.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; NEUMAN, R.;KEYTE,J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction towards DNA fingerprinting of singlecells. **NucleicAcids Res.**, v.16, p.10953-71,1998.
- JOBIM, L. F.; JOBIM M. R.; BRENNER, C. Identificação Humana pelo DNA: Investigação de Paternidade e Análise de Casos Forense. *in*: **Identificação Humana**, Tochetto, D. – coord., Porto Alegre: Sagra Luzzato, 1999. Parte IV, p.237-303.
- LEITE, Eduardo de Oliveira. **O exame de DNA: reflexões sobre a prova científica da filiação**. In: Repertório de doutrina sobre direito de família: aspectos constitucionais, civis e processuais.São Paulo, Revista dos Tribunais, 1999, v.4, p.220.
- LEWIN, B. **Genes VII**, Porto Alegre: Artmed, 2001.

- MADALENO, Rolf. A sacralização da presunção na investigação da paternidade. **Revista dos Tribunais**, São Paulo, ano 84, n.766, ago.1999.p.72.
- MIRANDA, A. **A Ciência contra o crime**. Monografia, licenciatura em Biologia, Centro Universitário de Brasília, Brasília –DF, 2000.
- PENA, S. **O DNA como única testemunha em determinação de paternidade**. São Paulo, Bioética, 1997, p.231.
- RASKIN, Salmo. **Manual prático do DNA para investigação de paternidade**. Curitiba, Juruá, 1999, p.08.
- RIZZARDO, Arnaldo. **Direito de família**. 1.ed., Rio de Janeiro, Aide, 1994, v.2, p.656.
- RODRIGUES, Sílvio. **Direito Civil**. 22.ed. São Paulo: Saraiva, 1997, v.6, p.327.
- SIMAS FILHO, Fernando. **A prova na investigação de paternidade**. 6.ed. revista e ampliada, Curitiba, Juruá, 1998, p.141.
- WEEDN, V. W; SWARNEN, S. L. Exames forenses de identificação por análises do DNA. *in*: Henry, J. B. et alii. **Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais**. 19.ed. São Paulo: Manole, 1998. Cap.63, p 1427-1438.
- WELTER, Pedro Belmiro. Investigação de Paternidade – obrigatoriedade do exame genético DNA. **Revista Jurídica**, Porto Alegre, n.246, abr.1998, p.12.
- ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.