

PADRONIZAÇÃO DE EXAMES DE DNA EM PERÍCIAS CRIMINAIS

1) Objetivos

- a) Assegurar a qualidade, integridade e segurança em exames periciais envolvendo a utilização de DNA;
- b) Estabelecer os procedimentos para condução da perícia criminal, análise e apresentação de resultados para a investigação criminal;
- c) Estabelecer os requisitos para os laboratórios de genética forense, bem como a qualificação dos peritos que neles realizarão as perícias baseadas em DNA.

2) Coleta e Custódia de Amostras e Instalações Ambientais

a) Coleta

- i) Os procedimentos de coleta e as análises iniciais deverão ser padronizados, através de manuais de coleta;
- ii) Em casos de crimes sexuais, deve-se coletar pelo menos dois suabes de algodão (haste plástica) de cada cavidade (vaginal, anal e /ou bucal). É aconselhável que cada Estado formalize, em dispositivo legal, os aspectos técnicos relacionados à coleta, preservação e custódia de amostras para exames de DNA. A Rede Nacional de Genética Forense recomenda a adoção de dispositivo nos moldes da Resolução 194 - SSP/SP (disponível em http://www.mj.gov.br/senasp/SUSP/pericias/pericia_dna.htm);
- iii) Todos os laboratórios devem ter um termo de consentimento informado, dispondo sobre os objetivos da coleta de material biológico de pessoas vivas, de acordo com modelo a ser definido posteriormente;
- iv) Os manuais de coleta devem conter especificações sobre a embalagem, o transporte e armazenamento de amostras biológicas;
- v) Todas as pessoas que participarem da custódia de amostras para exames de DNA, desde a coleta até a realização do exame, devem ser preparadas tecnicamente em procedimentos de coleta, acondicionamento, transporte e conservação de amostras biológicas. A preparação ou treinamento específico deverá estar inserido dentro dos cursos de formação a serem ministrados pelos laboratórios que integram a Rede Nacional de Genética Forense (ver item 6).

b) Custódia

- i) Os materiais e resultados obtidos a partir de amostras de evidências criminais devem ser organizados e armazenados adequadamente, pelo menos, até o fim do processo (julgamento);
- ii) A amostra bruta ou fração útil da mesma, e/ou DNA extraído, devem ser preservados para contraprova. As amostras devem ser armazenadas adequadamente com o objetivo de evitar a degradação;

- iii) A armazenagem das amostras deve ser definida com a ajuda da SENASP, através de consulta ao poder judiciário, tendo em vista a falta de normas, tanto em nível federal quanto estadual, sobre o prazo mínimo de armazenagem;
 - iv) A cadeia de custódia deve ser o mais curta possível, a fim de evitar a possibilidade de troca de amostras ou de degradação do material;
 - v) Preferencialmente, o perito que coleta as amostras não deve ser o mesmo que realiza os exames de DNA;
 - vi) Os laboratórios devem manter um sistema documentado de controle de vestígios, evidências e/ou amostras, que assegure sua integridade;
 - vii) Recomenda-se que os técnicos e/ou peritos que trabalhem em exames de DNA forense disponibilizem uma alíquota do seu próprio material genético para genotipagem e sequenciamento de DNA mitocondrial, quando este for de uso no âmbito do laboratório.
- c) Instalações Ambientais
- i) O desenho e instalações dos laboratórios devem respeitar as normas de segurança e minimizar os riscos de contaminação;
 - ii) O acesso e uso das áreas de análises devem ser controlados de modo apropriado aos fins a que estão destinados;
 - iii) Recomenda-se que os laboratórios disponham de áreas de trabalho separadas, com área para manejo de evidências e armazenamento de materiais, área de extração, área para PCR, área de extração de amostras mínimas e área para Pós-PCR. Como área mínima, os laboratórios devem conter: área de extração de DNA, área de pré-PCR e área de pós-PCR.

3) Marcadores Moleculares

- a) Para os Exames Interlaboratoriais e Bancos de Dados, os marcadores moleculares utilizados devem seguir os treze marcadores definidos pelo CODIS (TPOX, D3S1358, D5S818, FGA, CSF1PO, D7S820, D8S1179, TH01, vWA, D13S317, D16S539, D18S51 e D21S1) e a amelogenina;
- b) Estes marcadores devem ser disponibilizados em kits comerciais multiplex ou, quando não comerciais, devem ser de kits validados, com *primers* com escadas alélicas clonadas e seqüenciadas;
- c) Os laboratórios, dentro de seus exames rotineiros, podem estabelecer os marcadores necessários para a execução de seus laudos periciais. Contudo, recomenda-se a utilização dos treze marcadores mínimos acima citados;
- d) Deve ser incentivada a produção de kits multiplex de fluorescência desenvolvidos no Brasil, os quais preferencialmente devem ser validados por laboratórios da Rede Nacional de Genética Forense, antes de seu uso, conforme o item b);
- e) Recomenda-se que o Fundo Nacional de Segurança Pública/SENASP/MJ e o Ministério da Ciência e Tecnologia destinem recursos para pesquisas na área de genética forense, principalmente no que tange a produção e validação de marcadores moleculares e também de estudos populacionais e criação de banco de dados.

4) Interpretação dos Resultados e Análise Estatística.

- a) Recomenda-se a utilização da razão de verossimilhança para os casos de comparação entre amostra questionada e de referência onde as amostras não podem ser excluídas como sendo originadas da mesma pessoa;
- b) É desaconselhado o uso de probabilidade de coincidência em casos de estudos de identificação genética;
- c) Para o cálculo da razão de verossimilhança, de maneira conservadora, é recomendável realizar uma correção em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg de uma eventual estruturação. Considerar a utilização do parâmetro de subestruturação $\theta = 0,01$, em populações urbanas, e $\theta = 0,03$ em populações mais isoladas e potencialmente mais estruturadas, ou outro valor definido a partir de dados da população brasileira, nas seguintes fórmulas:

$$\text{para loci homozigotos} = \frac{[2\theta + (1 - \theta)p_i][3\theta + (1 - \theta)p_i]}{(1 + \theta)(1 + 2\theta)}$$

$$\text{para loci heterozigotos} = \frac{2[\theta + (1 - \theta)p_i][\theta + (1 - \theta)p_j]}{(1 + \theta)(1 + 2\theta)}$$

- d) Para a identificação de vínculo genético, recomenda-se a utilização dos relatórios “*ANNUAL REPORT SUMMARY FOR TESTING*” publicados pela AABB em http://www.aabb.org/Content/Accreditation/Parentage_Testing_Accreditation_Program/;
- e) Em casos de identificação de vínculo genético em primeiro grau, deve ser considerada exclusão a não coincidência em no mínimo dois *loci*, nos casos onde os genótipos forem heterozigotos e, de no mínimo três *loci*, quando pelo menos um dos genótipos forem homozigotos;
- f) Onde não ocorrer coincidência em no mínimo dois *loci*, outros marcadores deverão ser analisados para ser certificada a exclusão ou confirmada a ocorrência de mutação. Na existência de não coincidência, deverá ser estudado e incluído no laudo tanto as ocorrências das exclusões (inexistência de perfil coincidente para “x” *loci*) como as possibilidades de ocorrência de mutação (se disponível, incluir informação da taxa de mutação publicada para a situação). As mutações e taxas em que ocorrem deverão ser consideradas nos cálculos estatísticos de probabilidades de coincidências;
- g) Para os casos de paternidade criminal onde for considerada a ocorrência de mutação, o Índice de Paternidade parcial do locus onde foi detectado o evento mutacional será calculado a partir da fórmula μ / \hat{A} , onde μ = taxa de mutação do *locus* e \hat{A} = poder médio de exclusão do *locus*;
- h) Para tabelas de freqüências alélicas de amostras populacionais com 250 ou mais indivíduos deve-se aplicar a freqüência mínima de 1% independente do valor obtido experimentalmente. Para tabelas de freqüências alélicas de amostras populacionais menores que 250 indivíduos, deve-se aplicar a fórmula: $1 - [1 - (1 - \alpha)^{1/c}]^{1/2n}$, onde α é o intervalo de confiança = 0,05; c é o número de alelos do local analisado e n o número de pessoas da amostra (Budowle *et al*, 1996);

- i) Quando da utilização de marcadores uniparentais (cromossomo Y e DNA mitocondrial) para os propósitos citados no item anterior, devem ser seguidas as seguintes normas:
 - i) nos casos de microssatélites de cromossomo Y, recomenda-se a utilização de pelo menos o haplótipo estendido (DYS19, DYS385a,b; DYS389I/II; DYSDYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438 e DYS43) proposto pelo SWGDAM (2004) e amplamente utilizado em *Y Chromosome Haplotype Reference Database* www.yhrd.org;
 - ii) nos casos de DNA mitocondrial, recomenda-se a utilização das regiões hipervariáveis I e II (HVI e HVII), valendo-se de *primers* que compreendam cada região inteira, ou mesmo da utilização sucessiva de *primers* com produtos de amplificação menores, que somados abranjam as regiões HVI e HVII completas;
 - iii) Se houver no mínimo duas diferenças de nucleotídeos entre as amostras questionadas e de referência, as amostras podem ser excluídas como sendo originadas da mesma pessoa;
 - iv) Se houver somente uma diferença de polimorfismos entre as amostras questionadas e referência, o resultado será dado como inconclusivo;
 - v) Se as seqüências obtidas entre as amostras questionadas e de referência coincidirem, as amostras não podem ser excluídas como sendo originadas da mesma linhagem matrilinea;
 - vi) Se os haplótipos obtidos entre as amostras questionadas e de referência coincidirem, as amostras não podem ser excluídas como sendo originadas da mesma linhagem patrilinea;
 - vii) A interpretação dos tratos homopoliméricos deve ser feita de maneira padronizada seguindo as recomendações publicadas por (Wilson *et al*, 2002);
 - viii) Nos casos envolvendo marcadores uniparentais onde for detectada coincidência entre as amostras questionadas e de referência, recomenda-se a busca em banco de dados internacionais, ou, de preferência, nacionais. Após a busca em bancos de dados, é recomendável a utilização do método de contagem, relatando-se o número de vezes que o mesmo haplótipo foi encontrado em uma base de dados de “n” haplótipos;
- j) Na valorização da prova do DNA, para os cálculos estatísticos, deverão ser utilizadas informações de populações e de base de dados legítimas. Ou seja, na inexistência de informação sobre uma dada população brasileira, deverão ser consideradas base de dados cujas diferenças e semelhanças com as populações brasileiras estejam estabelecidas e cujos resultados tenham sido produzidos em laboratórios com creditação para a análise do DNA como instrumento de prova judicial;

5) Laudos Periciais

- a) O laudo pericial deverá conter, no mínimo, as seguintes informações:
 - i) Custódia das amostras
 - ii) Identificação do caso
 - iii) Tipo de caso
 - iv) Solicitação do exame

- v) Objetivo da Perícia
- vi) Descrição do vestígio
- vii) Descrição precisa da metodologia.
- viii) Interpretação dos resultados, com os resultados dos parâmetros utilizados.
- ix) Conclusões
- x) Assinaturas

6) Exames Interlaboratoriais e de Proficiência Técnica

- a) Os laboratórios devem realizar os seus controles de qualidade internos (ex: registros de genótipos do corpo técnico, medidas para evitarem contaminação exógena, etc.), e também participar de controles de qualidade no Brasil (entre laboratórios da Rede Nacional de Genética Forense) e também internacionais (por exemplo GEP e GITAD);
- b) Recomenda-se a SENASP financiar o aparelhamento dos laboratórios regionais, com o intuito de estabelecer o(s) laboratório(s) responsável(is) pela coordenação dos exames interlaboratoriais no país;
- c) Os exames de proficiência deverão ser anuais, definidos com os laboratórios regionais em conjunto com as universidades;
- d) Os laboratórios regionais de DNA devem realizar análises exclusivamente em casos criminais.

7) Qualificação Acadêmico-Profissional

- a) Os peritos que realizarão os exames laboratoriais deverão ser profissionais de nível superior, graduados em áreas de ciências biológicas, ciências da saúde ou áreas afins. Quando não graduados nestas áreas, deverão ter pós-graduação em genética ou áreas afins;
- b) O responsável pela chefia do Laboratório de DNA Criminal deverá ser perito oficial, graduado em áreas de Ciências Biológicas, Saúde ou áreas afins. Deve também possuir pós-graduação em Genética Forense, ou áreas afins, e experiência comprovada, de ao menos dois anos, em realização de exames periciais na área de genética forense. Os laboratórios em implantação, nos quais esta recomendação não tenha condição de ser contemplada, se reportarão à SENASP para a indicação dos laboratórios regionais que tenham as condições necessárias para auxílio técnico e/ou supervisão dos mesmos até que a condição sugerida seja contemplada;
- c) Os peritos que trabalharem em exames de DNA forense deverão ser aprovados no Curso de Especialização em Genética Forense para realizarem exames simples monitorados, e no Curso Prático Avançado para realizarem exames mais complexos, conforme o Programa dos Cursos. O Curso de Especialização em Genética Forense será ministrado pelos laboratórios das universidades e o Curso Prático Avançado pelos laboratórios regionais de DNA;

- d) Para a realização dos cursos citados no item anterior, os peritos deverão ser indicados pelos Estados e aprovados por uma comissão criada pela SENASP, sendo esta comissão formada por integrantes da Rede Nacional de Genética Forense;
- e) Aos peritos que tiverem experiência em exames de DNA forense será facultada a participação nos cursos descritos no item anterior;
- f) Deve ser estimulado, através do apoio financeiro dos Estados e da União, via SENASP, o aperfeiçoamento contínuo dos peritos envolvidos com as análises de DNA forense, bem como incentivar a publicação de trabalhos em revistas do Brasil e do exterior;
- g) Com o objetivo de prover os laboratórios com a formação necessária para os mesmos realizarem os exames de DNA com elevados níveis de confiabilidade, segurança e eficiência, serão ministrados, pelos laboratórios regionais em conjunto com universidades, os seguintes cursos:

Curso de Especialização em Genética Forense

Público Alvo: Peritos sem experiência prévia em análise de DNA forense, cuja minuta do programa se encontra a seguir (360 horas):

- i) Genética Mendeliana
 1. Transmissão da Informação Genética
 2. Teoria Cromossômica da Herança
 3. Mitose e Meiose
 4. Ligação
 5. Leis de Mendel
 6. Modos de Herança (mitocôndria, cromossomos X e Y, autossômicos, heredogramas)

- ii) Genética de Populações
 1. Polimorfismos
 2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg
 3. Desequilíbrio de Ligação
 4. Fatores Evolutivos
 - 4.1. Migração
 - 4.2. Seleção
 - 4.3. Mutação
 - 4.4. Deriva
 5. Endogamia, Gargalo Genético
 6. Parâmetros populacionais (estatística de Wright) (vide Vogel e Motulsky, 2000)

- iii) Genética Molecular
 1. Estrutura e propriedades do DNA
 2. Hibridização
 3. Métodos de análise
 - 3.1. Eletroforese
 - 3.2. PCR
 - 3.3. Seqüenciamento

- iv) Estatística Forense (vide Conselho Nacional de Pesquisa, 2001)
 1. Banco de Dados de Frequência
 2. Índice de Máxima Verossimilhança (Paternidade, Irmandade, Avuncular, Kinship...)
 3. Probabilidade de coincidência de dois perfis (*match probability*)
 4. Cálculo de Mistura de Amostra (vide Gill *et al*, 2006)
 5. Marcadores de Linhagem (Cromossomo Y e DNA mitocondrial)

- v) Coleta (teórico/prático) (vide Silva e Passos, 2002)
 1. Fundamentos da coleta
 - 1.1. Amostra Questionada X Amostra Referência (no local de crime X, no IML)
 2. Estudo de Local de Crime
 - 2.1. Reconstrução da Dinâmica do Crime

3. Coleta de Amostra
 - 3.1. Fluidos Biológicos
 - 3.2. Fibras (cabelos, pêlos, etc.)
 - 3.3. Suportes (cigarro, copo, ...)
 - 3.4. Coleta no cadáver (saliva, sob unhas, ...)
 - 3.5. Exumações
 - 3.6. Corpo carbonizado

vi) Kit de coleta

vii) Preservação do DNA

viii) Embalagem e envio de amostras

ix) Prática Forense (concomitante com o Curso Teórico – deverá ser gerada uma apostila com os principais protocolos)

1. Extração de DNA
2. Métodos de extração (fenol/clorofórmio, proteinases, detergentes, sais, álcoois)
3. Sangue Líquido (orgânico x chelex)
4. Manchas de sangue
5. Manchas de esperma
6. Suabe
7. Extração Diferencial (manchas com sêmen)

x) Purificação e Concentração do DNA

1. Quantificação do DNA
2. Quantificação de DNA total x DNA Humano
3. Hibridização
4. PCR em Tempo Real (teoria)

xi) PCR

1. Concentração de DNA
2. Inibidores
3. Monoplex, Multiplex

xii) Eletroforese

1. Em gel (agarose e poliacrilamida) (vide Ferreira e Grattapaglia, 1995)
2. Capilar (vide Butler, 2001)

xiii) Métodos de Detecção

1. Prata
2. Fluorescência (vide Butler, 2001)

xiv) Interpretação (estatística) e Laudo (vide página www.dna-view.com)

1. Taxa de Mutação (casos com mutação; frequência de mutação em STRs)
2. Dados fora de escala (para fluorescência)
3. Alelos nulos
4. Alelos raros

xv) Avaliação Final – Monografia

Curso Prático Avançado em Análise de DNA

Público Alvo: Peritos com experiência na realização de exames de DNA menos complexos, cuja minuta do programa se encontra a seguir (40 a 180 horas):

1. Cromossomos X e Y;
2. Seqüenciamento e mtDNA;
3. Amostras críticas (pêlo sem bulbo, osso,...);
4. STRs - Casos Complexos (reconstrução, estatística avançada
5. Outros, de acordo com as dificuldades.

8) Recomendações Finais

A comissão elaboradora destas padronizações entende que:

- a) a SENASP deve trabalhar em estreita colaboração com o Ministério da Ciência e Tecnologia, visando apoiar programas de pesquisa e desenvolvimento que estimulem as ciências forenses, cursos de mestrado e doutorado, bem como a participação em reuniões acadêmicas no Brasil e no exterior;
- b) as análises de DNA serão realizadas exclusivamente em materiais biológicos relacionados a ilícitos penais, conforme determina o Código de Processo Penal;
- c) devem ser realizadas revisões periódicas com o intuito de aprimorar as recomendações aqui presentes;
- d) a SENASP deve catalogar, organizar e disponibilizar, por meio eletrônico, genótipos dos principais locais genéticos estudados de diferentes regiões etnográficas do Brasil.

9) Bibliografia

- Balding, D.J. e Nichols, R.A. DNA profile match probability calculations: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Science International*, vol. 64, pp. 125–140. 1994.
- Budowle, B.; Smith, J.; Moretti, T. e DiZinno, J. *DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis*. Eaton Publishing, Natick, MA, EUA. 2000.
- Budowle, B.; Monson, K.L. e Chakraborty, R. Estimating minimum allele frequencies for DNA profile frequency estimates for PCR-based loci. *International Journal of Legal Medicine*, vol. 108, pp. 173-176. 1996.
- Butler, J.M. *Forensic DNA Typing: biology and Technology behind STR Markers*. Academic Press Ed, New York, NY, EUA. 2001.
- Conselho Nacional de Pesquisa. Comitê sobre Tecnologia do DNA na Ciência Forense. *A Avaliação do DNA como Prova Forense*. FUNPEC Ed, Ribeirão Preto, SP, Brasil. 2001.

- Curran, J.M. *et al.* What is the magnitude of the subpopulation effect?. *Forensic Science International*, vol. 135, pp. 1-8. 2003.
- Evett, I.W. e Weir, B.S. *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sinauer Associates Ed, Sunderland, MA, EUA. 1998.
- Ferreira, M.E. e Grattapaglia, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. EMBRAPA-CENARGEN, Documento 20, Brasília, DF, Brasil. 1995.
- Gill, P. *et al.* DNA comission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Science International*, vol. 160, pp. 90-101. 2006.
- Silva, L.A.F e Passos, N.S. *DNA Forense: Coleta de Amostras Biológicas em Locais de Crime para Estudo do DNA*. Ed. UFAL, Maceió, AL, Brasil. 2002.
- SWGDM. Report on the Current Activities of the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods Y-STR Subcommittee. *Forensic Science Communications*, vol. 6, nº3. 2004. (http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july2004/standards/2004_03_standards03.htm)
- National Institute of Justice, US Department of Justice. *Crime Scene Investigation: A Guide for Law Enforcement*. 2000. (<http://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/178280.pdf>)
- Vogel, F. e Motulsky, A.G. *Genética Humana*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2000.
- Weir, B.S. *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates Ed. Sunderland, MA, EUA. 1996.
- Wilson, M.R. *et al.* Recommendations for consistent treatment of length variants in the human mitochondrial DNA control region. *Forensic Science International*, vol. 129, pp .35-42. 2002.