



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA
Dissertação de Mestrado**

ANÁLISE GENÉTICA DOS VESTÍGIOS DE CRIMES SEXUAIS

PATRÍCIA BONILHA DE TOLEDO PIZA

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Rejane da Silva Sena Barcelos

**GOIÂNIA-GO
2012**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

ANÁLISE GENÉTICA DOS VESTÍGIOS DE CRIMES SEXUAIS

PATRÍCIA BONILHA DE TOLEDO PIZA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção de Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profª Drª Rejane da Silva Sena Barcelos.

P695a Piza, Patrícia Bonilha de Toledo.
Análise genética dos vestígios de crimes sexuais [manuscrito]
/ Patrícia Bonilha de Toledo Piza. – 2012.
xiii, 80 f. : il. colors.

Bibliografia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane da Silva Sena Barcelos.
Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica
de Goiás, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Programa
de Mestrado em Genética, 2012.

Inclui lista de abreviaturas e símbolos, figuras, gráficos e
tabelas.

1. Crime sexual - prova pericial - análise genética. 2. Prova
pericial. 3. *Y-STR*. I. Título.

CDU: 575:343.54:343.14(043.3)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1089 • Setor Universitário
Caixa Postal 88 • CEP 74620-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3948.1070 • Fax: (62) 3948.1070
www.pucgoias.edu.br • prp@pucgoias.edu.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA EM 31 DE AGOSTO DE 2012 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM NOTA

8,5 (oitoe meia)

Prof. Dra. Rejane da Silva Sena Barcelos / PUC Goiás
(presidente-orientadora)

Prof. Dra. Silviene Fabiana de Oliveira / UnB DF
(membro)

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres / UEG Goiás
(membro)

Dedico este trabalho à minha família, aos meus pais, em especial à minha mãe Norisa pelo apoio e incentivo, representando meu porto seguro nos momentos de incerteza; ao meu marido João Carlos, por entender que a minha ausência nos momentos de estudo é recompensada pela satisfação do meu ser; aos meus queridos e muito amados filhos Bruna, Tatiana e Matheus por representarem a razão da minha vida... das minhas buscas, dos meus tropeços e dos meus acertos; e ao meu amado neto Raphael, a luz do amanhã, o futuro e continuidade da minha família...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela existência e oportunidade de vida, pela família a qual componho e pelos amigos que me abraçam...

... a Gregor Mendel por me mostrar o quanto a Genética é instigante.

... a Biomedicina pelas oportunidades apresentadas à minha vida profissional.

... a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Rejane (“Re”) pela oportunidade de trabalharmos juntas, pelo incentivo e aprendizado, pela lisura, amizade e companheirismo de muitos anos.

... aos peritos criminais, técnicos e administrativos do Laboratório de Biologia e DNA Forense do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues (Goiânia-GO) pelo apoio ao trabalho, que sem ele nada teria sido realizado; em especial registro o meu agradecimento às peritas e amigas Neide e Laryssa.

... a equipe do Instituto de Genética Forense do Tocantins – perito criminal Wanderson, Selma, Maristela e Adriana – pela amizade, carinho, companheirismo e parceria de anos de trabalho.

... a Eliane Damásio Alves Dantas, *in memoriam*, amiga e colega de profissão na biomedicina e na perícia criminal, pelo exemplo de integridade profissional e pela garra e determinação em viver.

... aos governos do Tocantins e de Goiás por viabilizar este trabalho por meio do convenio entre as respectivas Secretarias de Segurança Pública, representadas pelas Superintendências de Polícia Técnico-Científica.

“O corpo da mulher vítima de um crime sexual é um corpo maculado, é um objeto de análise ao mesmo tempo biológico e jurídico, enquanto prova de um crime ou prova de uma possível denúncia infundada. É primeiramente sobre o corpo da mulher que o saber médico se coloca à disposição do saber jurídico, “auxiliando-o” a investigar a verdade dos fatos.”

Daniela Georges Coulouris

RESUMO

No Brasil a violência sexual é crime. O estupro e o estupro de vulnerável são crimes hediondos. Estima-se que apenas 10% dos estupros são registrados e dados da SENASP apontam 42.946 ocorrências policiais em 2010. A maioria das vítimas é do sexo feminino com idade abaixo de 14 anos. A ausência de prova pericial dificulta a condenação do agressor. Na vítima, os exames de corpo de delito de conjunção carnal e pesquisa de sêmen quando positivos não identificam o agressor e a negatividade não é fator de inexistência de agressão sexual. A análise genética, através da PCR e Y-STR permite identificar a presença de DNA masculino e o perfil genético do agressor. Este trabalho objetiva analisar amostras de vestígios de crimes sexuais para a obtenção de perfis moleculares de Y-STR. Foram selecionados 19 casos de crimes sexuais com ausência de suspeito, totalizando 20 vítimas do sexo feminino com idade entre 11 meses a 81 anos, que resultaram em 48 amostras questionadas, das quais 44 foram submetidas à extração diferencial e 4 à extração orgânica, totalizando 92 produtos de extração (44 FE, 44 FNE e 4 Orgânica). A quantificação de DNA pela PCR em tempo real detectou a presença de DNA masculino em 62% das amostras extraídas. Destas, 21 amostras foram selecionadas e normalizadas a uma concentração de Y-DNA entre 0,1 ng a 1,25 ng/reacção de PCR para Y-STR. A amplificação foi realizada com conjunto multiplex para 17 marcadores Y-STR e a eletroforese capilar foi procedida em analisador genético; os resultados foram analisados por programas específicos. Das 21 amostras amplificadas, 12 apresentaram resultados para Y-STR e seus haplótipos foram classificados como completo (17 Y-STR), mínimo (11 Y-STR) e incompleto (ausência de 1 ou mais Y-STR do haplótipo mínimo), resultando em 10 haplótipos mínimos e completos e 02 incompletos. Após confrontar os haplótipos mínimos e completos intra caso e entre os respectivos casos criminais, ficou evidenciado que as agressões sexuais foram cometidas, em cada caso, por um único agressor, não caracterizando crimes em série. É de fácil reconhecimento a importância que o haplótipo de Y-STR assume nas análises de crimes sexuais como prova pericial, principalmente quando este se torna a única informação genética do agressor a ser obtida de amostras questionadas. Os resultados apresentados neste estudo demonstraram a importância de serem analisados o maior número de marcadores polimórficos Y-STR para compor um haplótipo informativo, dando-se preferência a conjuntos multiplex que amplificam simultaneamente vários *loci*, incluindo marcadores polimórficos com produtos de até 200 pares de bases.

Palavras-Chave: Crime Sexual, Prova Pericial, Y-STR.

ABSTRACT

In Brazil sexual violence is a crime. Rape and vulnerable rape are heinous crimes. It is estimated that only 10% of rapes are recorded and the SENASP point 42.946 police incidents in 2010. Most victims are women aged below 14 years. The absence of expert evidence difficult the sentencing of the offender. In victim, exams corpus delicti of carnal knowledge and research of semen when positive do not identify the perpetrator and negativity is not a factor of no sexual assault. Genetic analysis by PCR-STR and Y identifies the presence of male DNA and the genetic profile of the perpetrator. This paper aims to analyze samples for traces of sex crimes to obtain molecular profiles of Y-STR. We selected 19 cases of sex crimes with no suspect, totaling 20 female victims aged 11 months to 81 years, which resulted in 48 samples questioned, of which 44 were subjected to differential extraction and 4 to organic extraction, totaling 92 products extraction (44 SF, 44 NSF and 4 Organic). The DNA quantitation by real-time PCR detected the presence of male DNA in 62% of the samples. Of these, 21 samples were selected and standardized to a concentration of Y-DNA 0.1 ng to 1.25 ng / PCR reaction for Y-STR. Amplification was performed for 17 joint multiplex Y-STR markers and electrophoresis capillary was preceded in genetic analyzer and the results were analyzed by programs. Of the 21 samples amplified, 12 had results for Y-STR and their haplotype been classified as full (Y-STR 17), minimum (11 Y-STR) and incomplete (absence of one or more of the Y-STR minimum haplotype) resulting 10 minimal haplotypes and complete and 02 incomplete. After comparing the minimum haplotypes and complete intra case and between their criminal cases, it was evident that the sexual assaults were committed in each case, by a single assailant, not featuring serial crimes. It is easy to recognize the importance that the Y-STR haplotype analysis assumes the sexual crimes as expert evidence, especially when it becomes the only genetic information of the offender being questioned samples obtained. The results presented in this study demonstrate the importance of being analyzed the largest number of polymorphic markers Y-STR haplotype to compose an informative, giving preference to multiplex sets that amplify multiple loci simultaneously, including polymorphic markers with products up to 200 base pairs.

Keywords: Sexual Crime, Expert Evidence, Y-STR.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

CODIS	: Sistema de Índice de DNA Combinado
DNA	: Ácido Desoxirribonucleico
FAP	: Fosfatase Ácida Prostática
FE	: Fração Espermatozoide
FNE	: Fração Não Espermatozoide
IGF	: Instituto de Genética Forense
IPC	: Controle Interno da Reação de PCR em Tempo Real
ICLR	: Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues
ISFG	: Sociedade Internacional de Genética Forense
LCN	: Baixo Número de Cópias
NDNAD	: Banco de Dados Nacional de DNA
NMLAF	: Núcleo de Metrologia e Laboratório de Análises Forenses
NPIA	: Agência Nacional de Aperfeiçoamento do Policiamento
OMS	: Organização Mundial da Saúde
PCR	: Reação em Cadeia da Polimerase
PSA	: Antígeno Prostático Específico
RFLP	: Variações no Comprimento de Fragmentos de Restrição
SENASP	: Secretaria Nacional de Segurança Pública
SPTZ	: Espermatozoide
STR	: Repetições Curtas em Tandem
SWGDM	: Grupo de Trabalho Científico sobre Métodos de Análise de DNA
VNTR	: Número Variável de Repetições em Tandem
Y-STR	: Marcadores Microsatélites do Cromossomo Y
ng	: Nanograma
µl	: Microlitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representando o cromossomo Y, apresentando as regiões pseudoautosômicas PAR 1 (região 1) e PAR 2 (região 2) e região não recombinante composta por eucromatina e heterocromatina30
- Figura 2.** Exame de triagem em vestígio utilizando luz forense.....41
- Figura 3.** Algumas das amostras selecionadas para análise no presente estudo. ...41
- Figura 4.** Perfil eletroforético de Y-STR ilustrando a amplificação de 8 *loci* na concentração de 0,30 ng/reação de PCR57
- Figura 5.** Perfil eletroforético de Y-STR ilustrando a amplificação de 17 *loci* na concentração de 0,37 ng/reação de PCR58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Distribuição do tipo de amostra selecionada para extração de DNA.50
- Gráfico 2.** Quantificação das amostras de DNA extraídas pelas metodologias diferencial e orgânica.54
- Gráfico 3.** Razão entre as concentrações de DNA autossômico e de DNA masculino [AUTO]/[Y] detectada como fonte única, mistura e indeterminada na quantificação dos produtos de extração da Fração Espermatozoide (FE), da Fração Não Espermatozoide (FNE) e da Orgânica.54
- Gráfico 4.** Amostras contendo DNA masculino na concentração de 0,1 a 1,25 ng/ reação de PCR submetidas à amplificação por Y-STR.56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos de crimes sexuais selecionados e resultados dos exames de pesquisa de espermatozoide (SPTZ) e de fosfatase ácida prostática (FAP) realizados no NMLAF.....	39
Tabela 2. Amostras selecionadas para análise, em suportes diversos e sua codificação.	40
Tabela 3. Quantificação de DNA masculino e a relação entre a concentração de DNA autossômico e a concentração de DNA masculino (Y) nos produtos de Extração Diferencial – fração espermatozoide (FE) e fração não espermatozoide (FNE) – e nos produtos de Extração Orgânica por amostra.	53
Tabela 4. Haplótipos de Y-STR observados nas amostras de crimes sexuais.	55
Tabela 5. Classificação dos haplótipos de Y-STR evidenciados.	59
Tabela 6. Haplótipos mínimos e completos do cromossomo Y obtidos por caso criminal.....	60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CRIMES SEXUAIS	14
1.2 CRIMINALÍSTICA, EXAME DE CORPO DE DELITO E PROVA PERICIAL	17
1.3 GENÉTICA FORENSE E OS CRIMES SEXUAIS	20
1.3.1 QUANTIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL	28
1.3.2 ANÁLISE MOLECULAR DE Y-STR	29
1.4 BANCO DE DADOS DE PERFIS GENÉTICOS	33
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 AMOSTRAS	38
3.1.1 PROCESSO DE SELEÇÃO	38
3.1.2 DAS AMOSTRAS	39
3.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	42
3.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE ORIGEM HUMANA E MASCULINA	44
3.4 AMPLIFICAÇÃO DE Y-STR	46
3.5 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	47
3.6 ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS	47
4 RESULTADOS	49
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS	49
4.2 EXAME DE TRIAGEM	51
4.3 ANÁLISE MOLECULAR	51
4.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA	51
4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	52
4.3.3 AMPLIFICAÇÃO DE Y-STR E DETECÇÃO DOS PRODUTOS	55
4.3.4 ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS	58
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	68
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 CRIMES SEXUAIS

Em 2002, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em seu primeiro relatório mundial sobre violência e saúde, definiu violência como sendo:

O uso intencional da força física ou do poder, real ou em ameaça contra si próprio, contra outra pessoa, ou contra um grupo ou uma comunidade, que resulte ou tenha possibilidade de resultar em lesão, morte, dano psicológico, deficiência de desenvolvimento ou privação de liberdade. (Portal da Saúde, 2012)

No contexto da violência insere-se a violência sexual, apresentando dados que mostram não haver distinção entre classes e segmentos sociais, etnia e idade. Crianças, adolescentes, adultos e idosos, de ambos os sexos, são vitimados, por um agressor inserido no contexto familiar ou fora dele, por pessoa conhecida ou desconhecida, acarretando uma série de efeitos em suas vidas, tais como: trauma emocional, medo, culpa, sequelas físicas, insônia, efeitos colaterais a medicamentos, dificuldade em retomar a vida sexual e ao trabalho, entre outros (Oliveira et al, 2005).

Segundo a OMS, violência sexual é definida como:

Qualquer ato sexual ou tentativa de ato sexual não desejada, ou atos para traficar a sexualidade de uma pessoa, utilizando coerção, ameaças ou força física, praticados por qualquer pessoa, independentemente de suas relações com a vítima, em qualquer cenário, incluindo, mas não limitado ao do lar ou do trabalho. (OMS, 2006)

A violência sexual é um fenômeno universal que em virtude do contexto emocional, familiar, religioso e social no qual a vítima se encontra, não obstante à sua idade, apresenta uma grande distorção entre o registro formal e o real número de agressões sofridas. A subnotificação e o subregistro ocorrem em todo o mundo, tornando desconhecida a verdadeira incidência (Drezett et al, 2001).

As agressões, em sua maioria, ocorrem em ambiente fechado e domiciliar. Quando domiciliar e sendo o agressor conhecido pela vítima, “como ocorre no abuso sexual intrafamiliar na infância ou na adolescência” (Drezett et al, 2004), este se vale do subterfúgio da autoridade e dela se privilegia para perpetrar impunemente a violência sexual.

O abuso de poder para com a vítima é imperativo tanto nas ocorrências isoladas, bem como nas crônicas que podem se prolongar por muito tempo. Como caracteriza Ballone et al (2003) “a vítima (criança, adolescente e mulher) é usada para gratificação sexual do agressor sem seu consentimento, sendo induzida ou forçada a práticas sexuais com ou sem violência física”.

Estudos relatam que a vítima preferencial deste tipo de agressão é a mulher (Ribeiro et al, 2004) e que o trauma físico, ou seja a lesão corporal apresentando danos genitais, pode não estar presente nas vítimas adolescentes e adultas, mas é frequentemente observado em crianças e idosas vitimadas (Oliveira et al, 2005; Faúndes et al, 2006; Drezett et al, 2011).

O estudo retrospectivo realizado por Drezett et al (2001) com 617 vítimas evidenciou o cenário da violência sexual quanto ao número de agressores, pois a agressão sofrida pelas vítimas foi perpetrada por um único agressor em mais de 90% dos casos, em 1,4% a agressão sexual foi praticada por dois agressores e, o restante do percentual apresentou mais de um agressor, variando de dois a até seis elementos.

No Brasil, por meio de legislação específica, os atos violentos de natureza sexual são tipificados como crime e estão inseridos no Código Penal, no Título VI - dos Crimes Contra a Dignidade Sexual, propriamente no Capítulo I – dos Crimes Contra a Liberdade Sexual – Estupro artigo 213, e no Capítulo II – dos Crimes Sexuais Contra Vulnerável – Estupro de Vulnerável artigo 217-A (CP, 1940).

Os crimes de Estupro e de Estupro de Vulnerável foram previstos também no artigo 1º da Lei dos Crimes Hediondos, sendo este tipo penal insuscetível de anistia, graça e indulto (Vianna, 2011). Assim, quando comprovados, não possuem circunstâncias atenuantes e o agressor cumpre a pena em regime fechado (Coulouris, 2004).

A caracterização do estupro de vulnerável ocorre quando a vítima apresenta: ser menor de quatorze (14) anos, ser portadora de enfermidade ou deficiência mental, não possuir o necessário discernimento para a prática do ato, ou não poder

oferecer resistência por qualquer outra causa. O limite de idade está fundamentado na condição de *inocencia consilli*, que implica na completa falta de ciência em relação aos fatos sexuais (Drezett et al, 2001).

A legislação brasileira ampara homens e mulheres vitimados por crimes contra a dignidade sexual. Contudo as mulheres, independentemente da faixa etária, estão mais expostas em virtude da realidade histórico-sócio-cultural que vivem; as agressões sexuais intrafamiliares por vezes não são denunciadas. Menos de 10% dos casos são notificados nas delegacias (Ribeiro et al, 2004; Souza e Adesse, 2005; Vieira et al, 2007; Casoy et al, 2011; Teixeira et al, 2012).

A pouca idade da vítima e, por vezes, a deficiência mental, são fatores que dificultam a verbalização das violências sofridas, bem como o não consentimento claro, a ausência de vestígios de lesão corporal no exame de corpo de delito, entre outros, são considerados pontos-cegos que dificultam sobremaneira o registro das ocorrências, exigindo esforços múltiplos por parte dos técnicos para a obtenção de informações que venham a contribuir para evidenciar a violência sexual sofrida (Schmickler e Borba, 2008).

Segundo Teixeira et al (2012), das 4.871 ocorrências registradas nas delegacias fluminenses no ano de 2011, 82,6% correspondem ao percentual de vítimas de estupro do sexo feminino e, deste percentual, 53,6% correspondem a estupro de vulnerável, ou seja, 2.156 vítimas com idade menor ou igual a 14 anos.

Dados do Ministério da Justiça, da Secretaria Nacional de Segurança Pública, relativos aos crimes contra a liberdade sexual revelam que no Brasil, em 2010, foram registradas 42.946 ocorrências policiais, sendo 38.540 ocorrências de estupro e 4.406 de tentativa de estupro (SENASP, 2011). Estas não indicam, necessariamente, o número de vítimas envolvidas, tão pouco o de agressores.

Ainda, no que tange aos registros formais, faz-se necessário somar a este quantitativo o índice relativo a “outros crimes que resultaram em morte” com 447 ocorrências, pois também inclui as ocorrências de estupro com resultado de morte (SENASP, 2011).

No Estado do Tocantins, em 2010, foram registrados 344 casos de estupros, 63 casos de tentativas de estupro e 06 outros casos de crimes resultantes em morte (SENASP, 2011). Quando estes dados são convertidos em taxa, o crime de estupro passa a ter uma taxa de 24,9 por 100 mil habitantes, chegando a ultrapassar o Estado de São Paulo cuja taxa estabelecida foi de 24,0 por 100 mil habitantes para

um quantitativo de 9.890 ocorrências de estupro no mesmo período (SENASP, 2011).

Uma questão preocupante observada nos crimes de estupro é a ausência de prova material para comprovar a queixa crime. “A palavra da vítima é valorizada de forma particular e considerada elemento basilar do processo, suficiente em alguns casos para condenar o réu” (Barros e Birol, [s.d.]).

Não obstante, os agentes jurídicos constroem e utilizam determinados estereótipos distintos para homens/acusados e mulheres/vítimas. Por vezes, a palavra da vítima é colocada em questão e o acusado é beneficiado pelo princípio do *in dubio pro reo* que o favorece com o benefício da dúvida (Coulouris, 2004).

A ausência de provas materiais dificulta a condenação do agressor e a condenação torna-se exceção que foge à regra comum de arquivamento e absolvição (Schmickler e Borba, 2008; Casoy et al, 2011). É importante enfatizar que a Justiça deve se precaver contra a condenação de um inocente, mas a prática jurídica não deve cometer injustiça em relação às vítimas (Coulouris, 2004).

No intuito de obter a materialidade do estupro, a criminalística dispõe de meios científicos para analisar a denuncia da ocorrência do delito. Conforme demonstrado por Drezett et al (2011), o resultado confirmatório do exame de corpo de delito de conjunção carnal corroborou para aumentar o percentual de condenação dos autores de crime de estupro. Já o exame de DNA, que permite identificar o autor da agressão sexual, de acordo com Casoy et al (2011), determinou a inclusão e a exclusão de suspeitos nos crimes sexuais de forma inquestionável.

1.2 CRIMINALÍSTICA, EXAME DE CORPO DE DELITO E PROVA PERICIAL

A Criminalística é uma ciência que tem por objetivo reconhecer e interpretar os indícios relativos aos crimes e à identificação dos envolvidos. Segundo determina a lei processual penal brasileira, nos crimes que deixam vestígios, é indispensável a realização do exame de corpo de delito. E este, por conseguinte, envolve tanto a materialidade dos fatos quanto os indícios de autoria (CPP, 1941).

Os estudos de crimes baseiam-se na existência de troca, ou seja, quando da perpetração de um crime, “o autor carregaria consigo substâncias denotativas de

sua presença no local do delito e/ou de seu contato com a vítima e, também, deixaria substâncias suas no local e/ou na vítima” (Mallmith, [s.d.]).

No âmbito da Criminalística, o corpo de delito é o fator desencadeador da perícia, ou seja, é qualquer ente material relacionado a um crime ou o próprio fato criminal no qual é possível efetuar um exame pericial. Como elemento principal, pairam ao seu redor os vestígios e para o qual convergem as evidências (Mallmith, [s.d.]).

Por meio das mais diversas ciências o delito é materializado em prova pericial, que de acordo com Espíndula (2002):

(...) a prova pericial é produzida a partir de fundamentação científica, enquanto que as chamadas provas subjetivas dependem do testemunho ou interpretação das pessoas, podendo ocorrer uma série de erros, desde a simples falta de capacidade da pessoa em relatar determinado fato, até o emprego de má-fé, onde exista a intenção de distorcer os fatos para não se chegar à verdade.

A resolução do crime de estupro pode estar condicionada às amostras coletadas no corpo da vítima, no corpo do agressor (quando apresentado pela autoridade policial), em vestes e na cena do crime (Torres et al, 2007).

A vítima de crime sexual deve realizar o exame de corpo de delito de conjunção carnal e a coleta de material biológico para exames que possibilitem a identificação do autor, tais como: “pêlos, cabelo, unhas, sangue, sêmen, fragmentos de pele (nas unhas da vítima)” (Faúndes et al, 2006), marcas de mordidas e/ou manchas de saliva.

No corpo da vítima coexistem os conceitos de corpo de delito e vestígio; o agressor pode deixar seus vestígios por todo o corpo da vítima, devendo ser coletado o maior número de amostras. Nos casos com vítimas fatais, o uso de luz forense pode auxiliar a coleta das amostras biológicas impregnadas na superfície do corpo (Torres et al, 2007).

O vestígio caracterizado pelo material biológico constitui-se em elemento fundamental para o esclarecimento do fato. Assim, pode-se confirmar se a vítima manteve relações sexuais recentes, mas não havendo sinais físicos de agressão não se pode afirmar se a relação foi forçada ou consentida e, tão pouco, se o acusado é o agressor (Mallmith, [s.d.]; Coulouris, 2004; De Paula, 2011).

A ocorrência de trauma genital (lesões, fissura perianal, rotura perineal, fissura de fúrcula vaginal) ou trauma anal, associado ou não ao trauma extragenital (hematoma, escoriações de diferentes extensões, mordeduras, lesões contundentes e lesões perfurocortantes), resulta na positividade do exame de corpo de delito (Drezett et al, 2001; id., 2011).

Deve-se também pesquisar a presença de sêmen por meio da análise laboratorial dos elementos comumente pesquisados nos laboratórios de Criminalística, a saber: espermatozóide (SPTZ), fosfatase ácida prostática (FAP), antígeno prostático específico (PSA, do inglês *Prostate-Specific Antigen*) e semelogeninas I e II (Sawaya e Rolim, 2004; De Paula, 2011). Estes, quando detectados nos vestígios materiais (secreções: vaginal, anal, oral; vestes, objetos, entre outros) caracterizam o contato sexual. A presença de espermatozoides no exame preliminar caracteriza a ocorrência de ejaculação, sendo prova irrefutável da presença de sêmen.

As pesquisas de FAP e PSA assumem grande importância nas ocorrências com agressores azoospermicos (patologia ou cirurgia/vasectomia) ou oligospermicos, pois a ausência ou baixa concentração de espermatozoides não será impedimento para indicar a presença de líquido seminal na vítima (Vieira et al, 2007).

Entretanto, conforme Carvalho ([s.d.]), a especificidade e a sensibilidade da FAP são questionáveis pela possibilidade da obtenção de resultados falso-positivos; a positividade de detecção nos vestígios não é fator conclusivo, mas sim sugestivo da presença de sêmen. Fator inverso pode ocorrer com o PSA, que em concentração elevada pode promover o chamado efeito *hook* em testes imunocromatográficos e também, por ser uma glicoproteína, pode sofrer degradação, resultando falso-negativo em ambas as situações; a negatividade não é fator determinante da inexistência de material espermático em vítimas ou vestígios materiais (Khaldi et al, 2004).

Diante do exposto, deve-se ter cautela na utilização dos exames preliminares de forma isolada e alguns aspectos devem ser considerados quando da sua realização, tais como: o período decorrido da agressão à coleta do material biológico, a realização de higiene íntima, a contaminação por fungos, o uso de preservativo, a ausência de ejaculação, o volume de sêmen depositado na cavidade

vaginal, o declínio da atividade biológica dos elementos pesquisados, FAP e PSA abaixo do limiar de detecção analítica (Khaldi et al, 2004).

Nos crimes sexuais o exame de conjunção carnal e os exames preliminares que detectam uma determinada amostra biológica (se: sangue, saliva, sêmen) e seus elementos, mesmo quando positivos não identificam e tão pouco individualizam o agressor. A investigação biológica não deve ser encerrada nesta etapa, estes exames devem servir como orientação para o uso de outras ferramentas analíticas, como as disponibilizadas pela Genética Forense no que tange aos exames de DNA.

1.3 GENÉTICA FORENSE E OS CRIMES SEXUAIS

Pode-se dizer que a expressão Forense foi atribuída à ciência Genética após serem descritos os marcadores moleculares do DNA e ao advento da técnica de RFLP (variações no comprimento de fragmentos de restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Em 1985, na Inglaterra, o professor Alec Jeffreys e colaboradores, descreveram a ocorrência de marcadores moleculares minissatélites com 500 a 1000 pb (pares de bases) contendo sequências nucleotídicas variáveis e de repetição com cerca de 15 a 35 pb (pares de bases) de comprimento, os VNTR (número variável de repetições em *tandem*, do inglês *Variable Number of Tandem Repeats*) (Jobling e Gill, 2004; Koch e Andrade, 2008). O número de repetições varia de pessoa para pessoa, ou seja, são indivíduo-específicos, o que permitiu revelar a “impressão digital do DNA” (Muniz e Silva, [s.d.]

Destaca-se a importância da impressão digital do DNA na área forense por possibilitar a identificação genética individual no contexto criminal. A técnica foi muito utilizada e teve sua admissibilidade como prova nos tribunais a partir de 1986 (Alves, 2009), contribuindo para a resolução de homicídios, condenação de criminosos e exclusão de inocentes, além de casos de paternidade e de imigração. Como exemplo, o “Caso *Leicester*”, na Inglaterra, em que a análise do perfil genético identificou o agressor e assassino de duas adolescentes por meio dos vestígios, ou seja, das amostras biológicas deixadas nos corpos das vítimas estupradas e assassinadas, cujos perfis genéticos foram confrontados ao perfil genético de vários

suspeitos até se obter uma coincidência entre os perfis dos vestígios e de um dado suspeito; este resultado foi aceito como evidência criminal levando à prisão e condenação do autor dos crimes (Wanbaugh, 1989).

Denota-se que a evolução da Genética Forense vem percorrendo os caminhos da análise da variabilidade genética humana; o estudo do genoma humano mostrou que entre quaisquer dois seres humanos a similaridade genética é observada em aproximadamente 99,9% da sequência do DNA nuclear e que cerca de 0,1% desta sequência é variável entre as pessoas, conferindo-lhes particularidades individuais; exceto entre gêmeos monozigóticos (Alho, 2004; Neto, 2004).

Qualquer segmento específico de DNA humano com cerca de 1.000 pares de bases (pb) de tamanho contém, em média, apenas 1 pb que varia entre 2 indivíduos na população e, as diferentes versões de uma certa sequência de DNA em um determinado local do cromossomo (*locus*), são chamadas de alelos (Nussbaum et al, 2002). Considerando que um indivíduo apresenta um par de cromossomos autossômico (um de origem paterna e outro de origem materna) terá dois alelos em cada *locus* que determinam o seu genótipo, podendo ser heterozigoto ou homozigoto (Marano et al, 2010). A frequência na qual os alelos são encontrados na população em geral determina a ocorrência de polimorfismo genético ou de variante rara; quando os alelos são tão comuns que são encontrados em mais de 1% dos cromossomos na população em geral, os alelos constituem o que é conhecido como um polimorfismo genético, enquanto que os alelos com frequências menores de 1% são, por convenção, variantes raras (Nussbaum et al, 2002).

Os polimorfismos, quando analisados por marcadores genéticos, tornam-se elementos importantes para os estudos intra e inter populacional, por distinguirem habilmente as diferentes versões alélicas de um *locus* a vários *loci*, herdadas ou não, de um gene ou segmentos do genoma (sequência de DNA), fornecendo ferramentas para uma ampla gama de aplicações. O DNA é utilizado como elemento de identificação na área forense devido a análise de regiões que apresentam maior variação individual (Duarte et al, 2001).

Segundo Cavalli-Sforza et al (1994) (apud Marano et al, 2010), “o termo polimorfismo refere-se à presença de mais de um alelo de um mesmo gene ou segmento de DNA em uma população; um *locus* é dito polimórfico quando o seu alelo mais comum tem frequência igual ou inferior a 99%”.

Grandes avanços tecnológicos foram incorporados à Genética Forense como a técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), a descoberta de novos marcadores moleculares, o desenvolvimento de novos equipamentos e tecnologias que, somados ao progresso da informática, promoveram a automatização dos procedimentos analíticos e conseguinte melhoria dos resultados (Rodrigues, 2008).

A técnica da PCR é uma das grandes aliadas da Genética Forense, pois revolucionou a genética molecular permitindo a análise do DNA de forma rápida e versátil (Strachan e Read, 2002). Com a finalidade de amplificar milhões de cópias de regiões alvo da molécula do DNA, por meio de amplificação seletiva e rápida clonagem, permite o estudo do polimorfismo genético através de marcadores moleculares como os microssatélites STR (repetições curtas em *tandem*, do inglês *Short Tandem Repeats*) que contêm poucos pares de bases e encontram-se dispersos por todo o genoma humano (Jobling e Gill, 2004; Koch e Andrade, 2008; Lewin, 2009).

Os *loci* STR possuem sequências repetidas em tandem que vão de 2 a 7 pares de base, com comprimento total em torno de 350 pares de bases após a amplificação pela PCR. Geralmente, os *loci* contendo tetra e pentanucleotídeos são frequentemente utilizados com o propósito de identificação humana. O número de alelos em um *locus* STR de interesse forense, ou seja, com poder de discriminação genotípica entre dois indivíduos selecionados aleatoriamente que possuam genótipos distintos, geralmente varia de 3 a 8 (Patrinos e Ansorge, 2010), já os mais informativos podem apresentar mais de uma dezena de alelos diferentes, sendo esta diversidade vinculada à variabilidade do número de unidades repetidas contidas no segmento de DNA (Marano et al, 2010).

Para que a amplificação ocorra nas regiões alvo de interesse, é necessária a presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers* ou amplificadores) para cada região alvo do DNA, conforme descrevem Strachan e Read (2002):

Após os *primers* terem sido adicionados ao DNA-molde desnaturado, eles se ligam especificamente às sequências de DNA complementares ao seu sítio-alvo. Na presença de uma DNA-polimerase termoestável apropriada e de precursores de DNA (os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos, dATP, dCTP, dGTP e dTTP), eles iniciam a síntese de novas fitas de DNA, que são complementares a cada uma das fitas de DNA do segmento-alvo de DNA e que irão se sobrepor.

A PCR é uma reação em cadeia porque as fitas de DNA, recentemente sintetizadas, irão atuar como moldes para mais uma síntese de DNA nos ciclos subsequentes. Após cerca de 25 ciclos de síntese de DNA, os produtos da PCR irão incluir, além do DNA que iniciou a reação, cerca de 10^5 cópias da sequência-alvo específica, uma quantidade que é facilmente visualizada como uma banda distinta de tamanho específico quando submetida à eletroforese em gel de agarose.

A PCR ameniza, por vezes, as dificuldades de se obter perfil genético das amostras biológicas oriundas de vestígios e de vítimas de crimes. A amplificação ocorre com pouquíssimo DNA-alvo, permitindo a análise de amostras que não teriam condições de serem analisadas por outras técnicas que exigem uma quantidade bem maior de DNA total. Amostras degradadas, antigas e em decomposição, com quantidade insignificante de células nucleadas são realidade no cotidiano da genética forense; os bons resultados podem ser atribuídos a alta estabilidade química do DNA, a extrema sensibilidade da PCR, bem como, a análise de vários microssatélites co-amplificados em uma única reação de PCR.

Contudo, a alta sensibilidade atribuída à PCR tem um limite quanto à quantidade e qualidade mínimas do DNA a ser analisado, este dois aspectos quando muito comprometidos são fatores limitantes para a obtenção de um perfil genético; fatores ambientais como luz solar, microrganismos e componentes químicos, os quais o DNA da amostra biológica fica exposto, também devem ser considerados (Budowle, 2010).

Vários tipos de vestígios contendo amostras biológicas de diferentes origens celulares, como: sangue, sêmen, saliva, cabelo, ossos, dentes, entre outros, são objeto de análise nas ocorrências de crime; nos sexuais observa-se a predominância, mas não a exclusividade, do sêmen (Pinheiro, 2008; Budowle, 2010). A análise genética pode determinar o perfil genético do infrator e estabelecer uma ligação entre ele e o local do crime e/ou a vítima, pois o objetivo em se obter a identificação genética está na elucidação do crime.

Nas análises genéticas de interesse forense, os cromossomos autossômicos destinam-se à identificação individual, o DNA mitocondrial estabelece a linhagem matrilinear, os cromossomos sexuais (X e Y) corroboram nas identificações individuais e, o cromossomo Y, em especial, além de estabelecer a linhagem patrilínea, em muitas ocorrências de crime sexual, é a informação genética disponível e determinante (Jobling e Gill, 2004; Koch e Andrade, 2008).

O perfil genético obtido do vestígio é um perfil questionado, ou seja, busca-se saber a origem do “doador/contribuidor masculino” deste perfil por meio de comparação com um perfil genético de referência (sabidamente obtido da vítima e do suspeito). Ao comparar os perfis e resultar em diferença, excluí-se a possibilidade das amostras terem se originado da mesma pessoa. Se forem coincidentes, de acordo com o número de marcadores genéticos utilizados e as frequências populacionais dos alelos identificados, determina-se a probabilidade de se encontrar ao acaso na população uma pessoa com o mesmo perfil genético, estabelecendo a força da evidência genética. O equilíbrio de Hardy-Weinberg será utilizado para estimar as proporções genotípicas a partir das proporções fenotípicas se a condição de independência ficar evidenciada entre os marcadores utilizados (Rodrigues, 2008).

Nos crimes sexuais a determinação do perfil genético de uma amostra questionada pode solucionar ou direcionar uma investigação criminal, tornando-se uma ferramenta eficiente na identificação do agressor. Contudo, para viabilizar a obtenção desta informação genética deve-se (a) coletar todos os vestígios (amostras biológicas) presentes no corpo da vítima, (b) prever a existência de mistura de material biológico do agressor e da vítima nas amostras questionadas, (c) estabelecer possibilidades quanto as propriedades do sêmen do agressor, (d) verificar as características das amostras questionadas coletadas de vestes e do local de crime (objetos manipulados pelo agressor); levando-se em conta que a obtenção da maioria das amostras questionadas deve ocorrer num período até 24 horas do fato ocorrido (Torres et al, 2007). Destarte, informações contidas no exame de corpo de delito de conjunção carnal e exames preliminares para a pesquisa de sêmen, entre outras pesquisas como sangue e saliva, podem auxiliar na escolha da estratégia a ser estabelecida na condução das análises genéticas.

Ainda, além dos aspectos acima, os de ordem legal devem ser considerados para a elucidação do crime: ter a indicação de suspeito pela autoridade competente, obter consentimento para coletar a amostra de referência do suspeito, bem como da vítima e, na existência, do parceiro consentido desta.

Segundo Hirschfeld et al (2005), “a identificação e separação do conteúdo masculino presente nestas misturas de materiais biológicos entre a vítima e o contribuidor é um desafio complexo e até mesmo bastante difícil, dependendo da composição destas amostras”.

Não são poucos os obstáculos encontrados quando se busca determinar perfil genético em amostras questionadas com mistura de material biológico da vítima e do agressor (*swabs*: vaginal, anal, oral; swab com tecido epitelial e saliva; raspado subungueal com sangue e/ou tecido epitelial). As diferentes concentrações entre as frações feminina e masculina, com predomínio da fração feminina, bem como as questões anteriormente mencionadas relativas a contribuidores azoospermicos ou oligospermicos, com baixas concentrações de material masculino, inibidores, mecanismos de degradação, pouca quantidade de DNA, entre outros, podem culminar em amostras biológicas sem qualquer resultado de perfil genético ou com resultados de difícil interpretação (De Paula, 2011).

Amostras contendo pouca quantidade de DNA genômico, quantidade inferior a 0,1 ng (nanograma), por definição são consideradas amostras LCN (do inglês, *Low Copy Number*), necessitam de um método de análise particular para aumentar a sensibilidade e possibilitar a detecção de DNA, pois não é viável a análise pelos métodos rotineiramente usados nos laboratórios de genética forense. Para obter um resultado melhor a quantidade de ciclos da PCR pode ser aumentada para 34 ciclos, porém podem surgir alguns artefatos que podem inviabilizar a análise de misturas: (a) aumento do tamanho dos produtos de *stutter* (pico resultante de cópias incompletas de alelos) que ultrapassam de 5 a 15% do tamanho do alelo correspondente, podendo ser designados por falsos alelos; (b) desaparecimento de um dos alelos de um *locus* (alelo *dropout*) considerando o *locus* homocigoto quando na verdade é heterocigoto; (c) desequilíbrio heterocigótico por efeito da variação estocástica que independe do tamanho do alelo, no qual um alelo contendo baixo número de cópias se amplificado, por acaso, nos primeiros ciclos da PCR, será amplificado preferencialmente nos ciclos seguintes e terá uma dimensão muito maior do que a do outro alelo do mesmo *locus*; (d) *locus dropout* quando nenhum dos alelos do *locus* é detectado em virtude da variação estocástica ou degradação do DNA (normalmente para *loci* com maiores fragmentos de amplificação); e (e) aparecimento de alelos extra (alelo *dropin*) como consequência de contaminações esporádicas, que são detectadas pelo fato do método ser muito sensível (Lagoa, 2007).

Para melhor interpretar os perfis genéticos LCN, um conjunto de regras foi proposto (Gill et al, 2000 e Whitaker et al, 2001 apud Lagoa, 2007), a saber: utilizar o método de “consenso” – efetuar múltiplas amplificações da mesma amostra e

apenas considerar como verdadeiros os alelos presentes em, pelo menos, duas dessas amplificações; analisar os controles negativos – se os controles negativos, com um conjunto de amostras, revelarem os mesmos alelos em, pelo menos, dois desses controles, esses alelos não devem ser considerados em nenhuma amostra e, se possível, estas devem ser reanalisadas; e se for detectado algum alelo numa amostra que não pertença ao perfil do suspeito, outras metodologias de identificação devem ser consideradas.

As amostras LCN se defrontam com um dos gargalos da genética forense, pois haverá amostras que a quantidade de vestígio disponível a ser coletado para análise é muito pouca, impossibilitando, por vezes, as repetições propostas nas regras para a interpretação destas amostras. Há também aquelas que são expostas aos interferentes ambientais tornado-se muito degradadas e inviabilizando a análise.

Outro ponto a ser abordado é a extração e purificação do DNA, sendo imprescindível utilizar a metodologia mais adequada frente às amostras forenses em virtude da escassa quantidade e qualidade do DNA presente nos vestígios. O tipo de amostra e o estado de conservação devem orientar o método de escolha para a obtenção do DNA; o sucesso em obter um perfil genético está vinculado à quantidade suficiente, qualidade e purificação do DNA extraído dos vestígios (O'Donnell et al, 2008; Patrinos e Ansorge, 2010).

A extração direta pode resultar em um único produto de DNA proveniente de um dado vestígio, sendo este DNA de uma única amostra biológica ou de uma mistura com duas ou mais amostras biológicas; como exemplo na extração orgânica a lise celular ocorre em uma única etapa (Pacheco, 2010) para todos os tipos celulares presente na amostra questionada, liberando o DNA nuclear.

No entanto, nos crimes sexuais, os vestígios que apresentam misturas de material biológico do agressor com espermatozoides e células epiteliais, e da vítima com células epiteliais orientam a realização da extração diferencial com lise celular em duas etapas. O emprego de detergentes fracos, na primeira etapa, libera o DNA das células epiteliais resultando na fração não espermatozoide (FNE) e, na segunda etapa, há o emprego de detergentes fortes para liberar o DNA dos espermatozoides resultando na fração espermatozoide (FE); o sucesso deste método depende da qualidade da amostra e da etapa de digestão com a enzima proteinase K (Tereba et al, 2004; Torres et al, 2007; Pacheco, 2010).

Há também uma gama de *kits* comerciais disponíveis para a extração de vários tipos de amostras biológicas e, em especial, para as amostras de crime sexual com a realização de extração diferencial em etapas distintas, com tampões de separação de fases e digestão seletiva (por meio da enzima proteinase K) das células epiteliais e dos espermatozóides e centrifugação para a separação do DNA das FNE e FE (Tereba et al, 2004).

Em seus estudos, De Paula (2011), detectou a presença de DNA masculino em 43% dos casos de estupro analisados com amostras biológicas sem espermatozóides, fato que gerou uma mudança na rotina laboratorial no que tange a análise de amostras com possibilidade de identificar estupradores.

Nos crimes sexuais, a identificação do perfil genético masculino presente em um vestígio com mistura de amostras biológicas masculina e feminina por meio dos marcadores STR autossômicos nem sempre é possível, principalmente quando a fração masculina está proporcionalmente bem menor que a fração feminina, pois na amplificação por PCR a fração feminina terá amplificação preferencial por causa da competição com os regentes da PCR e, a fração masculina, será pouco ou não detectada. Contudo, se na amplificação forem utilizados marcadores STR específicos para o cromossomo Y, os Y-STR, a competição de reagentes que ocorre com os marcadores STR autossômicos será substancialmente reduzida (Patrinos e Ansorge, 2010).

Os Y-STR podem proporcionar um perfil genético específico da fração masculina, oriunda do agressor, presente nas amostras questionadas (*swabs* vaginal, raspado subungueal, manchas, entre outras), mesmo quando esta estiver em nível muito baixo para detectar os STR autossômicos ou para ser interpretada de forma confiável. A tomada de decisão quanto aos marcadores a serem utilizados na obtenção de perfis genéticos das amostras questionadas, se STR-autossômico e/ou Y-STR, dentre outros marcadores moleculares disponíveis na genética forense, uma outra ferramenta analítica torna-se muito necessária assumindo grande importância que é a quantificação da PCR em tempo real, detalhada abaixo (Torres, 2007; O'Donnell et al, 2008; Applied Biosystems, [s. d]).

A análise genética dos marcadores Y-STR para identificar a fração masculina em amostras de crime sexual é de grande importância para a obtenção de resultados que permitam a identificação de agressores por meio dos vestígios encontrados junto às vítimas e em locais de crimes (Johnson et al, 2005).

1.3.1 QUANTIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real monitora o progresso da PCR durante os ciclos, ou seja, em tempo real; assim os dados são coletados ao longo da PCR e não apenas no final da reação, utilizando o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez (Applied Biosystems, [s. d.]).

O método mensura a quantidade de ciclos de PCR necessários para a detecção do produto de amplificação em cada amostra. Os dados são coletados durante a fase exponencial, quando a quantidade do produto da PCR é diretamente proporcional à quantidade do DNA molde utilizado (Green et al, 2005).

Esta metodologia norteia os procedimentos quanto à amplificação dos produtos de extração, quantifica simultaneamente o DNA humano e o DNA masculino e detecta parâmetros qualitativos como inibidores e degradação do DNA (Mattei e Albuquerque, 2008).

Os kits comerciais validados para a área forense permitem a quantificação do DNA genômico humano total (DNA masculino e feminino); do DNA masculino; e de ambos, DNA genômico humano total e DNA masculino, obtendo-se a proporção entre eles e a respectiva concentração. Estes kits podem utilizar sistemas distintos para detectar a sequência alvo, a saber: Taqman, Syber Green e Plexor HY.

A quantificação do DNA, no âmbito da genética forense, deve ser realizada nos produtos de extração das amostras questionadas, não obstante nos crimes sexuais, pois a quantificação do DNA genômico humano total e do DNA masculino norteiam a tomada de decisões sobre os métodos de análise mais adequados para cada amostra questionada visando a obtenção dos perfis genéticos da vítima e do agressor (Mattei e Albuquerque, 2008).

Nas amostras indicativas da presença de mistura de DNA feminino e masculino, três aspectos importantes devem ser considerados na quantificação da PCR em tempo real: a detecção específica de DNA masculino, as quantidades relativas entre DNA humano e DNA masculino e a presença de inibidores detectados na amostra analisada. É importante avaliar a possibilidade de obter DNA

autossômico do contribuinte masculino, mas quando este está em uma proporção menor, em torno de 5 a 10 % do DNA humano total da amostra, a sua obtenção é dificultada, sendo indicado a amplificação com Y-STR. Amostras contendo a relação de DNA masculino frente ao DNA humano total na proporção de 1:1000 sugere-se prosseguir a amplificação com Y-STR (Applied Biosystems, 2008).

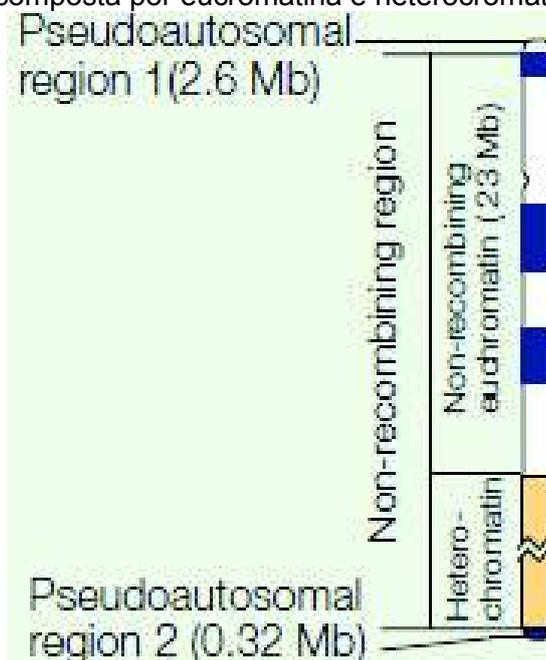
Como todo e qualquer vestígio pode sofrer a ação de processos de degradação do DNA, a quantificação da PCR em tempo real também possibilita interpretar os resultados de perfis genéticos incompletos, quando são detectados os marcadores moleculares microssatélites em torno de 200 pares de bases e, os maiores, em torno de 350 pares de bases, não; mesmo quando a amplificação do DNA é realizada em uma concentração ideal, ou seja, em torno de 1,0 nanograma. O que remete a busca do perfil genético completo com o uso de outros marcadores moleculares com tamanho de até 200 pares de bases (Torres et al, 2007).

1.3.2 ANÁLISE MOLECULAR DE Y-STR

O cromossomo Y é estruturalmente pequeno, acrocêntrico, com cerca de 60 Mb de DNA, sendo geneticamente inerte em sua maior parte e composto por heterocromatina em parte do braço longo (q), consistindo de diferentes tipos de DNA não codificador, alta e moderadamente repetitivos. Em sua maior parte o cromossomo Y (Figura 1) não se recombina, exceto nas regiões distais, pseudoautossômicas, homólogas ao cromossomo X, definidas como:

- Região pseudoautossômica maior (*PAR1*) estende-se por 2,6 Mb desde a extremidade do braço curto do Y, e, pelo que se sabe contém uns 12 genes. (...). Essa região tão pequena chama a atenção por sua alta frequência de recombinação (...). Foi demonstrado que a fronteira entre a região pseudoautossômica maior e a região sexo-específica se localiza no gene do grupo sanguíneo *XG*, e que o gene *SRY*, determinante do sexo masculino, situa-se a apenas uns 5 kb dela.
- Região pseudoautossômica menor (*PAR 2*) estende-se por 320 kb na extremidade do braço longo, nessa região a recombinação não é tão frequente (...). (Strachan e Read, 2002).

Figura 1. Esquema representando o cromossomo Y, apresentando as regiões pseudoautosômicas PAR 1 (região 1) e PAR 2 (região 2) e região não recombinante composta por eucromatina e heterocromatina



Fonte: Jobling e Gill, 2004

Está presente no DNA nuclear com a frequência de apenas uma cópia por célula, possui um padrão de transmissão sexo-específico, determina o sexo masculino e estabelece uma linhagem patrilinear, ou seja, de pai para filho. A região não recombinante apresenta grande importância para a genética forense por representar uma fonte de marcadores moleculares polimorfismos para a análise do DNA masculino (Jobling e King, 2004). O polimorfismo dos marcadores microssatélites Y-STR baseia-se nos diferentes números de repetições de uma dada sequência de nucleotídeos presente num *locus* dentre os indivíduos da população, e os alelos são determinados pelos diferentes tamanhos dos produtos de amplificação, que diferem pelo aumento de repetição ou posição de repetição (Patrinos e Ansorge, 2010).

O perfil genético dos Y-STR é alelo único (apenas um cromossomo Y) sendo segregado como haplótipo; está intimamente ligado à linhagem masculina de uma família. Os Y-STR são utilizados como marcadores uniparentais na elucidação de casos que envolvam o parentesco biológico por via paterna, como nos casos de paternidade e na identificação de pessoa desaparecida, tendo como doadores de amostra de referência os parentes paternos, obtendo a informação específica do

componente masculino para a comparação direta entre o haplótipo Y questionado e o haplótipo Y de referência (Jobling e King, 2004).

Para Butler (2007), o cromossomo Y apresenta algumas vantagens na análise forense: (1) a específica amplificação do DNA masculino amplia a gama de casos possíveis à obtenção de prova material com resultados de DNA, incluindo os casos com mistura de material genético masculino/feminino; (2) simplicidade técnica devido ao perfil ser alelo único, permitindo obter resultados com baixas concentrações de DNA masculino do agressor, pois não há perda de alelo heterozigoto por efeito estocástico na amplificação da PCR; (3) a natureza haplotípica permite estimar o número de contribuintes masculinos, ou seja, o número de agressores envolvidos em um caso de estupro.

Os Y-STR representam uma poderosa ferramenta na resolução dos crimes sexuais, principalmente os que envolvem mistura desbalanceada de material genético, com excesso de material de origem feminina e escasses de material de origem masculina (Jobling e King, 2004; Wolf et al, 2005, Gusmão et al, 2006). Segundo Jobling e Gill (2004), o haplótipo Y consegue ser efetivo numa proporção de até 4.000 vezes inferior à concentração do material genético feminino presente na mistura. Já, De Paula (2011), demonstrou ser possível obter até 100% de amplificação do haplótipo Y, nas amostras de mistura de DNA masculino/feminino numa proporção de até 1:12.000.

Nas ocorrências de crime sexual com agressor azoospermico ou oligospermico, a presença de células nucleadas no sêmen, tais como: as células germinativas imaturas, os leucócitos e as células epiteliais; presentes em uma concentração de 15% do material espermático permitem a obtenção de Y-STR. As glândulas do trato genital masculino (próstata e vesículas seminais) são a principal fonte de células epiteliais no sêmen. Estudos realizados com indivíduos vasectomizados, em que as amostras de sêmen analisadas foram doadas antes e depois do procedimento cirúrgico, revelaram a amplificação e obtenção de DNA masculino; a menor concentração de DNA masculino observada foi na amostra pós-vasectomia, a qual apresentou a mesma qualidade e os mesmos alelos do perfil obtido na amostra pré-vasectomia (Vieira et al, 2007).

Dentre os mais de 200 marcadores Y-STR com potencial uso em genética forense (Jobling e Gill, 2004; Gusmão et al, 2006), o SWGDAM (grupo de trabalho científico sobre métodos de análise de DNA, do inglês *Scientific Working Group*

DNA Analysis Methods) estabeleceu um conjunto de Y-STR para compor um haplótipo mínimo (min Ht) composto pelos microssatélites: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385I e DYS385II. Posteriormente, este haplótipo foi ampliado com a adição de dois outros *loci*, o DYS438 e DYS439, sendo denominado de haplótipo estendido.

Gusmão et al (2006) sugerem que na análise de pequenas quantidades de DNA é importante ter um conjunto multiplex disponível para amplificar rapidamente muitos marcadores, devendo ser considerada a co-amplificação quando da seleção dos Y-STR, e que a determinação do número de indivíduos que contribuem para a mistura de DNA em uma mancha pode ser estabelecida com a análise dos Y-STR desde que não seja possível estabelecer conclusões com marcadores moleculares autossômicos.

Estes critérios estão relacionados à condição de herança de linhagem patrilinear que o cromossomo Y apresenta, pois o perfil de Y pode pertencer a mais de um indivíduo do sexo masculino de uma mesma família se estes indivíduos possuírem vínculo genético com um ancestral masculino em comum (ou seja, pai/filho, irmão/irmão, avô/pai/filho) (Koch e Andrade, 2008).

Mutações espontâneas no cromossomo Y podem ocorrer através das gerações estabelecendo um grau de diferenciação e esta diferenciação também aumenta quando são utilizados mais marcadores Y-STR e/ou Y-STR que possuam uma taxa maior de mutação. Isto também é visto em populações com um certo grau de interrelação. Em algumas regiões isoladas com populações endogâmicas, existe forte identidade de cada grupo, embora as diferenças ainda possam ser observadas com o aumento do número de *loci*. A informação de linhagem é muito útil, desde que seja interpretada e relatada corretamente (Hornstein, 2012; Gusmão et al, 2006).

Na análise genética dos vestígios de crimes sexuais, o Y-STR pode disponibilizar a única informação a ser comparada para se estabelecer uma conclusão (SWGDM, 2009).

1.4 BANCO DE DADOS DE PERFIS GENÉTICOS

Na esfera criminal, a Inglaterra foi o primeiro país a criar um banco de dados de perfis genéticos com o fito de armazenar e correlacionar os perfis; possui uma ampla base de dados com aproximadamente três milhões de perfis e diariamente insere mais de mil perfis de amostras biológicas extraídas dos vestígios de crime, de indivíduos suspeitos e condenados pela prática dos mais variados crimes (Carracedo et al, 2010).

Inúmeros são os crimes que permanecem sem conclusão; em Portugal, um quinto dos casos permanece em aberto pela inexistência de um suspeito (Corte-Real, 2004). A ausência de um banco de dados de perfis genéticos, por vezes, impede a elucidação de diversos crimes; fato que apenas pode ser modificado quando o suspeito doa amostra biológica para a obtenção de seu perfil genético, o qual é analisado e comparado ao obtido de um dado vestígio.

Um banco de dados de perfis genéticos possibilita a identificação do suspeito se o seu perfil tiver sido previamente inserido, bem como, informa se o mesmo havia se envolvido em outros crimes. Outro aspecto importante e que abrange a utilização do banco de dados é o seu uso nas ocorrências vinculadas ao desaparecimento de pessoas e de vítimas de desastres (Corte-Real, 2004).

O estabelecimento de um banco de dados de perfis genéticos deve seguir alguns padrões e regras, incluindo os critérios de entrada, permanência, armazenamento e ou retirada dos perfis genéticos, sendo legalmente estabelecidas por legislação específica que varia de país para país (Johnson et al, 2003).

A iniciativa empreendida pela Inglaterra gerou resultados positivos à segurança pública daquele país, com incremento na taxa de resolução de crimes de 26% para 40% em 2006 depois da inserção dos perfis genéticos dos vestígios encontrados em local de crime (Lima, 2008). Desde 1998, o NDNAD (Banco de Dados Nacional de DNA, do inglês *National DNA Database*) confrontou mais de 300.000 crimes com a ajuda do banco de dados e, dados estatísticos recentes informam que no período de abril de 2011 a março de 2012 o banco de dados realizou 124 confrontos de assassinato, 522 confrontos de estupro e 28.996 confrontos de outras cenas de

crime (NPIA, [s. d.]). Especificamente, o uso de Y-STR, mesmo sendo um marcador uniparental de linhagem masculina, tem demonstrado resultados positivos nas questões que envolvem pessoas desaparecidas (pesquisa entre familiares) e sucesso em investigações criminais, tanto na exclusão do suspeito como na identificação do criminoso (NPIA, 2011).

Os Estados Unidos seguiram a iniciativa da Inglaterra e criaram o *Combined DNA Index System* – CODIS – programa de gerenciamento de perfis genéticos de propriedade do *Federal Bureau of Investigation* (FBI); demais países do continente europeu e americano também criaram bancos de dados de perfis genéticos (Corte-Real, 2004).

O CODIS tem por finalidade reunir diferentes bancos de perfis genéticos denominados “Índices”, ou seja, um índice destinado aos perfis vinculados a locais de crime (índice forense), outro índice para criminosos condenados; também permite índices para a identificação de pessoas desaparecidas e para a identificação de vítimas de desastres. Os perfis armazenados são obtidos por meio de marcadores moleculares STR autossômicos e, mais recentemente, Y-STR e sequências de DNA mitocondrial (FBI, 2010).

Em julho de 2012, o FBI divulgou haver mais de 9.812.200 perfis de condenados, 1.181.300 perfis de suspeitos e 441.200 perfis de amostras questionadas. Quanto às buscas por meio do cruzamento entres perfis, foram realizadas mais de 185.000 buscas em mais de 177.500 investigações (FBI, [s. d.]).

No Brasil, em 28 de maio de 2012, foi sancionada a Lei nº 12.654 que prevê (1) a coleta de material biológico para a obtenção de perfil genético como forma de identificação criminal, e (2) a criação de banco de dados de perfis genéticos. Sua aplicação está prevista para o réu condenado por crime doloso praticado com violência de natureza grave contra pessoa e por crime hediondo, bem como para os suspeitos, durante as investigações e por determinação judicial, para apurar a autoria do crime. As informações genéticas armazenadas no banco de dados de perfis genéticos serão gerenciadas por unidade oficial de perícia criminal e “não deverão revelar traços somáticos ou comportamentais das pessoas, exceto determinação genética de gênero” (Brasil, 2009).

O uso do CODIS no Brasil é regulado pelo Termo de Compromisso firmado entre a Polícia Federal e o FBI. Atualmente conta com uma rede de dezesseis (16) laboratórios do segmento da segurança pública, da perícia criminal, sendo um (01)

na esfera federal e quinze (15) na estadual. Estes laboratórios possuem a tecnologia e recursos humanos capacitados para obter os resultados com o padrão de qualidade exigido, mas não conseguem realizar plenamente o seu papel em virtude da ausência de suspeito, pois a lei que regulamenta o banco de dados de perfis genéticos entrará em vigor no decorrer do segundo semestre de 2012, sendo esperado, conforme experiências internacionais, um aumento no percentual de elucidação dos crimes, pois no Brasil menos de 10% dos homicidas são identificados adequadamente e conseqüentemente condenados, sendo a ausência de prova material é um dos pontos relevantes para o arquivamento dos inquéritos e denúncias (Aguiar et al, 2011).

A taxa de homicídio brasileira ocupa o sexto lugar mundial, sendo uma questão de grande preocupação não somente ao segmento da segurança pública, mas também a toda população (Aguiar et al, 2011). Um banco de dados de perfis genéticos eficiente auxilia na prevenção do crime, pois é sabido que o criminoso comete delitos de menor proporção para depois cometer um grave delito (Corte-Real, 2004).

No Brasil, os índices relativos aos crimes sexuais merecem uma consideração especial – as 42.946 ocorrências policiais registradas no ano de 2010 (SENASP, 2011) podem representar apenas 10% do real quantitativo dos crimes perpetrados. A análise dos marcadores moleculares STR autossômicos está consolidada em nível mundial como gerador de perfil genético para banco de dados criminais, mas quando analisados em amostras contendo misturas desbalanceadas com material genético feminino/masculino, que em virtude da amplificação preferencial do componente feminino que, na grande maioria dos casos, apresenta-se em maior proporção, pode não haver a detecção (parcial ou completa) do perfil genético do agressor, perdendo-se esta valiosa evidência.

Os Y-STR veem sendo analisados rotineiramente nos casos de crimes sexuais pelos Laboratórios de Genética Forense. Hornstein (2012), em estudo recente envolvendo quarenta (40) casos de crimes sexuais, analisou os vestígios de mistura feminino/masculino com STR autossômicos e apenas dez (10) casos obtiveram resultado de perfil genético autossômico; os trinta (30) casos restantes sem perfil genético autossômico foram analisados com Y-STR e destes, dez (10) casos obtiveram os respectivos perfis do cromossomo Y; aumentado significativamente o número de perfis informativos para confronto.

Casoy et al (2011) aponta que estupradores em serie cometem “homicídios sexuais”, como ocorreu com o estuprador Francisco de Assis Pereira, conhecido como “Maníaco do Parque”, que matou onze (11) vítimas no Parque do Estado na cidade de São Paulo, entre 1998 até a sua prisão; em 2002 foi condenado a 274 anos de prisão (Folha de São Paulo, 2000).

Nos casos de crimes sexuais que os vestígios possuem uma mistura de material feminino/masculino desbalanceada com amplicação preferencial da fração feminina e, também, quando os resultados da análise do perfil genético dos STR autossômicos resultam em mistura de difícil interpretação, a análise dos Y-STR pode resultar perfis informativos a serem comparados com amostras de referência, ou ainda, a diversas amostras questionadas, como ocorre nos bancos de dados de perfis genéticos, com ou sem a indicação de um suposto agressor (Honda et al, 2009; Hanson e Ballantyne, 2007).

A evidência obtida com os Y-STR não pode ser desprezada, ela informa a existência de DNA masculino, o número de agressores do delito e o perfil do cromossomo Y (O’ Donnell et al, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar amostras de vestígios de crimes sexuais para obtenção de perfis moleculares de Y-STR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter perfis moleculares utilizando marcadores Y-STRs.
- Isolar o perfil molecular do contribuinte masculino utilizando o protocolo de extração diferencial e orgânica.
- Correlacionar as frações espermatozoide (FE) e não espermatozoide (FNE) quanto a presença de DNA masculino.
- Estimar o número de contribuintes masculinos frente ao perfil haplotípico obtido.
- Verificar a existência de coincidência haplotípica intra e entre os casos criminais.
- Estabelecer haplótipos informativos para confronto futuro em banco de dados de perfis Y-STR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

3.1.1 PROCESSO DE SELEÇÃO

Para a realização deste trabalho foi efetuada uma seleção nos casos de crimes sexuais registrados no Instituto de Genética Forense (IGF) do Estado do Tocantins entre os anos de 2005 a 2012. O IGF foi criado em agosto de 2011, estando subordinado à Superintendência da Polícia Técnico-Científica da Secretaria de Segurança Pública do Estado do Tocantins, objetivando realizar as perícias em genética forense de todo o Estado.

Anteriormente à sua criação, estas perícias ficavam sob a responsabilidade do Instituto de Criminalística Valdivino Tundelo. Todas as solicitações de perícia desta natureza foram repassadas ao IGF, que por estar em fase de implementação, prioriza a realização das perícias que contêm amostras de referência de suspeitos encaminhados pelas autoridades competentes, chamadas “caso fechado”. Por conseguinte, defronta-se com uma demanda reprimida no que tange à realização de “caso aberto”, ou seja, caso que não há o encaminhamento de suspeitos como amostra referência.

Utilizou-se como critério de seleção os casos abertos contendo vestígios diversos, e como controle de nosso trabalho foi selecionado um caso de crime sexual analisado no ano de 2005 em laboratório cooperado (à época), o qual foi gerado um Laudo de Identificação Biológica por análise do DNA.

3.1.2 DAS AMOSTRAS

No presente trabalho foram selecionados dezenove (19) casos de crimes sexuais, cujas vítimas foram atendidas na Polícia Técnico-Científica do Estado do Tocantins. Os exames de corpo de delito de conjunção carnal foram realizados no Instituto Médico Legal e os exames preliminares de pesquisa de sêmen – pesquisa de espermatozoide (SPTZ) e pesquisa de fosfatase ácida prostática (FAP) – foram realizados pelo Núcleo de Metrologia e Laboratório de Análises Forenses (NMLAF) do Instituto de Criminalística Valdivino Tundelo (Tabela 1).

Tabela 1. Casos de crimes sexuais selecionados e resultados dos exames de pesquisa de espermatozoide (SPTZ) e de fosfatase ácida prostática (FAP) realizados no NMLAF.

CASO Nº	VÍTIMA IDADE	EXAME LABORATORIAL		
		DATA	SPTZ	FAP
01	53 anos	19/04/05	POSITIVO	POSITIVO
02	23 anos	25/09/06	NEGATIVO	NEGATIVO
03	11 anos	20/06/08	NEGATIVO	NEGATIVO
04	34 anos	16/08/08	POSITIVO	POSITIVO
05	32 anos	04/05/09	POSITIVO	POSITIVO
06	18 anos	21/12/09	NEGATIVO	NEGATIVO
07	07 anos ¹	07/12/09	POSITIVO	POSITIVO
08	11 meses ²	19/04/10	NEGATIVO	NÃO REALIZADO
09	NC	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA
10	18 anos	14/03/11	POSITIVO	NÃO REALIZADO
11	18 anos	28/03/11	NEGATIVO	NÃO REALIZADO
12	11 anos	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA
13	18 anos	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA
14	81 anos	05/08/11	NEGATIVO	NEGATIVO
15	14 anos	02/01/12	NEGATIVO	NEGATIVO
16	16 anos	16/02/12	NEGATIVO	NEGATIVO
17	11 anos	05/07/11	NEGATIVO	POSITIVO
18	15 anos	NÃO CONSTA	NEGATIVO	POSITIVO
19	18 anos	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA
	16 anos	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA	NÃO CONSTA

Nota: 1. Segundo consta, a vítima foi agredida repetidas vezes pelo mesmo agressor.

2. Segundo consta, o agressor utilizou a mão para realizar a agressão.

Os vestígios vinculados aos casos de crimes sexuais foram selecionados e destes foram geradas e codificadas 48 amostras de interesse para este estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Amostras selecionadas para análise, em suportes diversos e sua codificação.

Nº	VESTÍGIO / AMOSTRA	SUPORTE	CODIGO DA AMOSTRA
01	Secreção Vaginal	Lâmina corada	01.Q1
02	Secreção Vaginal	Lâmina não corada	02.Q1
03	Secreção Vaginal	Lâmina não corada	03.Q1
	Secreção Anal	Lâmina corada	03.Q2
	Corda	Extremidade com nó	03.Q3a
Extremidade sem nó		03.Q3b	
04	Secreção Vaginal	Lâmina não corada	04.Q1
05	Secreção Vaginal	Lâmina corada	05.Q1
06	Preservativo	Lado interno	06.Q1a
		Lado externo	06.Q1b
	Secreção Vaginal	Lâmina corada	06.Q3
07	Secreção Vaginal	Lâmina corada	07.Q1
08	Secreção Anal	Swab	08.Q1
	Secreção Vaginal	Swab	08.Q2
	Secreção Bucal	Swab	08.Q3
	Secreção Vaginal	Lâmina corada	08.Q4a
	Secreção Anal	Lâmina corada	08.Q4b
	Secreção Bucal	Lâmina corada	08.Q4c
09	Preservativo	Lado externo	09.Q1a
		Lado interno	09.Q1b
10	Secreção Vaginal	Swab	10.Q1
	Secreção Vaginal	Lâmina corada	10.Q2
11	Shorts	Recorte	11.Q2
	Sutien	Recorte	11.Q3
	Secreção Vaginal	Lâmina corada	11.Q5
12	Preservativo	Lado externo	12.Q1a
		Lado interno	12.Q1b
	Preservativo	Lado externo	12.Q2a
		Lado interno	12.Q2b
	Embalagem de Preservativo	Local da abertura/corte	12.Q3
	Embalagem de Preservativo	Local da abertura/corte	12.Q4
13	Flanela Amarela	Recorte	13.Q1
	Saia de Vermelha	Recorte	13.Q2
14	Secreção Vaginal	Swab	14.Q1
	Secreção Vaginal	Lâmina não corada	14.Q2
	Secreção Peniana	Swab	14.Q3
15	Shorts	Recorte	15.Q1
	Colcha Estampada Floral	Recorte	15.Q5c
	Secreção Vaginal	Lâmina não corada	15.Q9
16	Secreção Vaginal	Swab	16.Q2
	Preservativo	Lados interno e externo	16.Q4a
	Preservativo	Lados interno e externo	16.Q4b
	Substância líquida do pote c/ 02 preservativos	Swab	16.Q4c
17	Secreção Vaginal	Lâmina corada	17.Q1
18	Secreção Anal	Swab	18.Q1
	Meio de Cultura para Transporte de Amostra Biológica	Gel	18.Q1a
19	Preservativo	Lado externo	19.Q1a
		Lado interno	19.Q1b

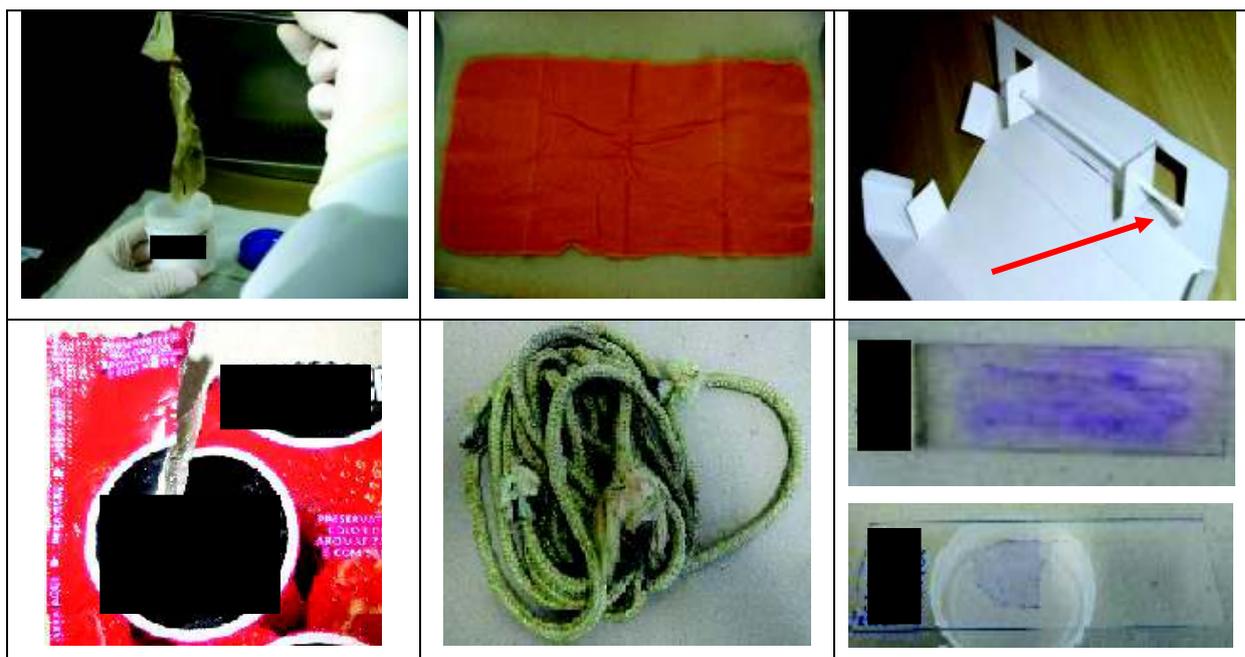
Após a seleção, as amostras foram submetidas a uma inspeção visual por observação direta. Para as amostras diversas de secreções biológicas foi utilizado, na análise, o equipamento de luz forense, multiespectral com o objetivo de visualizar vestígios biológicos latentes (Figura 2).

Figura 2. Exame de triagem em vestígio utilizando luz forense.



As amostras biológicas analisadas no presente estudo foram secreções vaginal, oral, anal, peniana, preservativos, e indumentárias: short, *soutien*, saia, bem como, corda, embalagem de preservativo, flanela e colcha (Figura 3).

Figura 3. Algumas das amostras selecionadas para análise no presente estudo.



As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia e DNA Forense do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues (ICLR) da Superintendência de Polícia Técnico-Científica da Secretaria de Segurança Pública e Justiça do Estado de Goiás.

3. 2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Em casos de crimes sexuais, em uma análise laboratorial, encontram-se células epiteliais, leucócitos, células germinativas imaturas e espermatozoides. Em tais casos, recomenda-se a utilização de uma metodologia de extração que resulte na separação das células femininas (da vítima) das células masculinas (do agressor) denominada extração diferencial (Gill et al, 1985; Yoshida et al, 1995). Essa extração fundamenta-se em separar os espermatozoides na presença de um excesso de células epiteliais femininas. Quarenta e quatro (44) amostras foram extraídas por este método; as amostras foram manipuladas com todo o procedimento padrão em relação aos equipamentos de proteção individual.

O protocolo utilizado seguiu o presente procedimento:

1. As amostras foram analisadas e, fragmentos das mesmas, foram selecionados e inseridos em microtubos estéreis. Adicionou-se 400 µl de tampão de extração da fração não-espermatozóide - FNE (TRIS/EDTA/NaCl – 10 mM TrisHCl/ 1mM EDTA/ 100 mM de NaCl pH 8,0; Sarkosil a 20%; água; Proteinase K a 20 mg/ml). As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 18 horas.
2. As partículas sólidas foram separadas por uso de uma cesta adaptada ao microtubo. As amostras foram centrifugadas a 12000 RPM por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo estéril, sendo identificado como fração não-espermatozóide (FNE).
3. Ao precipitado do primeiro tubo, adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem de esperma - FE (10 mM TrisHCl; EDTA; NaCl, SDS a 2%, pH 7,5). Houve o procedimento de centrifugação a 12000 RPM por 5 min. O sobrenadante foi descartado. O processo de lavagem acima descrito foi realizado por mais duas vezes. Ao tubo foi adicionado tampão de

extração da fração espermatozoide – FE (Tris/EDTA/NaCl; Sarkosil a 20%, água, Proteinase K 20 mg/ml e DTT 1mol/l). O microtubo foi submetido ao procedimento de homogeneização por 10 seg., vedado com filme plástico e incubado a 37°C por 24 horas. Nesta fase obtém-se a fração espermatozoide – FE.

4. Foi adicionado então, aos dois microtubos contendo a fração espermatozoide (FE) e a fração não-espermatozóide (FNE) 400 µl de clorofane (Clorofane: fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 da Sigma®). Os microtubos foram centrifugados a 12000 RPM por 5 min., a fase aquosa foi transferida para microtubo estéril contendo membrana de purificação Amicon®100K (Millipore); submetido a centrifugação 20 min. por 14000G; foi adicionada a unidade concentradora e de purificação 300 µl de água ultra-pura e novamente centrifugada nas mesmas condições do passo anterior.
5. Ao término, transferiu-se a unidade concentradora e de purificação para um segundo microtubo estéril adicionando 40 µl de água ultra-pura para o microtubo contendo a fração não-espermatozóide (FNE) e 20 µl ao microtubo contendo a fração espermatozoide (FE). Após inverteu-se a unidade e procedeu-se a recuperação do DNA por centrifugação (1000G por 2 min.).

Das quarenta e oito (48) amostras, quatro (04) delas foram submetidas ao procedimento de extração pelo protocolo modificado de extração orgânica de DNA para manchas de amostras biológicas, segundo os procedimentos utilizados pelo "Federal Bureau of Investigation" (FBI) (Budowle et al, 1995). As amostras foram manipuladas com todo o procedimento padrão em relação aos equipamentos de proteção individual.

O protocolo utilizado seguiu o procedimento abaixo:

1. Aos microtubos contendo fragmentos das amostras questionadas foram adicionados 300 µL do tampão de extração de manchas (SEB), composto por Tris-HCL 10mM, NaCl 100mM, EDTA 10mM, DTT 1mol/L, SDS 2%, pH 8,0 e Proteinase K 20 mg/mL.
2. Os microtubos foram vedados com filme plástico e incubados em banho a 56°C por 18h.

3. Ao material extraído foram adicionados 300µL de clorofane (Clorofane: fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1 da Sigma®). O material foi centrifugado por 5 min. a 12000 RPM; a fase aquosa foi transferida para microtubo estéril contendo membrana de purificação Amicon®100K (Millipore); submetido à centrifugação 20 min. por 14000G.
4. Foi adicionada a unidade concentradora e de purificação 300 µl de água ultra-pura e novamente centrifugada nas mesmas condições do passo anterior.
5. Ao término, transferiu-se a unidade concentradora e de purificação para um segundo microtubo estéril adicionando 40 µl de água ultra-pura. Após, inverteu-se a unidade e procedeu-se a recuperação do DNA por centrifugação (1000G por 2 min).

Nas amostras em que não se detectou a presença de DNA foram submetidas a um novo processo de extração utilizando-se os *Kits* comerciais Differex® System (PROMEGA) para uso com estante magnética e DNAIQ™ System (PROMEGA). Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA DE ORIGEM HUMANA E MASCULINA

As amostras extraídas foram quantificadas com o emprego do *Kit* comercial Plexor® HY System, validado para uso em amostras forenses, o qual quantifica DNA humano total (autossômico) e DNA masculino (Y) presentes na amostra. O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

A tecnologia Plexor® está baseada na interação específica de dois nucleotídeos modificados, iso-dC e iso-dG. Um iniciador contém a base modificada iso-dC ligada a um marcador fluorescente, que será complementar ao iso-dGTP ligado ao “apagador de fluorescência” presente no mix de PCR do *kit*. À medida em que a amplificação ocorre, o iso-dC fluorescente vai se ligando ao iso-dGTP com apagador, resultando na perda de fluorescência. Portanto, a reação com Plexor® mede o decréscimo de fluorescência. Com o Plexor® HY é possível analisar a curva de melt, ferramenta que permite verificar a especificidade da reação (Promega, [s.d.]).

O processo de quantificação foi realizado utilizando-se o equipamento Bio-Rad iQ™5 Real-Time PCR Detection System.

Os resultados foram analisados com o programa Plexor® Analysis, que determinou a quantificação de DNA autossômico e DNA masculino presentes nas amostras, estabeleceu a razão entre DNA autossômico e DNA masculino ([AUTO] / [Y]), bem como a análise de controle interno padrão (IPC).

Em virtude do DNA alvo amplificado pelo Plexor® HY ser multicópia no genoma e devido às variações de indivíduo-para-indivíduo com relação ao número de cópias dos alvos no genoma, nem sempre uma amostra única de DNA masculino (sem mistura com DNA feminino) terá um valor da razão [AUTO] / [Y] = 1. Os valores 0,4 a 2,0 são comumente observados em amostras unicamente masculinas. A razão [AUTO] / [Y] acima de 5 sugere amostras com mistura de DNA feminino e masculino, sendo este em menor proporção. Razões de [AUTO] / [Y] entre 2 a 5 não devem ser consideradas amostras únicas de DNA masculino ou mistura de DNA (feminino e masculino), pelos motivos já mencionados no que tange ao DNA alvo multicópia e as variações indivíduo-para-indivíduo; estudos de validação e padronização devem ser estabelecidos pelos laboratórios (Promega, [s.d.]).

Nas amostras em que não foi detectada a presença de DNA masculino, uma segunda quantificação com o *Kit* comercial Plexor® HY System, foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Esta segunda quantificação foi realizada com o objetivo de minimizar os possíveis resultados negativos devido à ocorrência de erros no procedimento técnico (p. ex. pipetagem).

Das amostras em que a quantidade de DNA masculino foi considerada satisfatória nos aspectos volume (µl) e concentração mínima (DNA masculino ≥ 0,1 ng/reação de PCR para Y-STR) estabelecidos para a continuidade deste trabalho, foi necessário fazer nova seleção, pois, como são amostras forenses, análises realizadas com marcadores STR autossômico devem ser priorizadas por favorecerem a individualização do agressor. Portanto, essas amostras foram armazenadas para amplificação futura com o objetivo de conclusão do inquérito policial.

Face ao exposto no parágrafo anterior, vinte e uma (21) amostras continuaram em análise para Y-STR no presente trabalho.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DE Y-STR

Ressaltamos que foram armazenadas alíquotas de todas as amostras extraídas para a futura realização de amplificação utilizando-se a metodologia do DNA autossômico pelas características das amostras já mencionadas.

De acordo com os resultados da quantificação por PCR em tempo real, as vinte e uma (21) amostras selecionadas para a análise de Y-STR foram submetidas a um processo de normalização, efetuando-se diluição ou concentração do produto de extração, com o objetivo de obter a concentração de DNA em um mínimo de 0,1 ng a um máximo de 1,25 ng/reação de PCR.

A concentração de DNA proposta e utilizada neste trabalho para a amplificação dos Y-STR difere da concentração de DNA recomendada pelo fabricante do *kit* utilizado, que recomenda que a concentração de DNA masculino esteja entre um mínimo de 0,5 ng/ reação de PCR a um máximo de 1,00 ng/ reação de PCR.

As amostras foram submetidas à amplificação pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o sistema multiplex AmpF ℓ STR[®] Yfiler[®] Kit composto por dezessete (17) marcadores STR situados no cromossomo Y (DYS456, DYS389 I, DYS389 II, DYS392, DYS393, DYS438, DYS390, DYS458, DYS19, DYS385 I/II, DYS391, DYS439, DYS635, Y_GATA_H4, DYS437 e DYS448), validado para amostras forenses (Mulero et al, 2006).

As reações de PCR foram realizadas com volume final de 25 μ L, sendo: 0,8 μ L Taq DNA Gold (Applied Biosystems), 9,2 μ L Reaction Mix, 5,0 μ L de Primer set, e 10,0 μ L de produto de extração de DNA em solução aquosa numa concentração entre 0,1 ng/reação de PCR a 1,25 ng/reação de PCR. As amplificações foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. (Collins et al, 2004; Mulero et al, 2006).

3.5 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos resultantes da amplificação foram, então, separados pela metodologia de eletroforese capilar com detecção simultânea de fluorescência no analisador genético ABI 3130 Avant[®] (Applied Biosystems).

Para a aplicação dos produtos de amplificação no analisador genético, um microtubo para cada produto foi identificado e um mix foi preparado utilizando-se os seguintes reagentes: 8,7 µL formamida Hi-Di[™] (Applied Biosystems); 0,3 µL GS 500 LIZ size standart (Applied Biosystems) e 1,0 µL de produto amplificado. Após o preparo, os mesmos foram submetidos a injeção no sequenciador por um período de 10 segundos e posterior eletroforese a 15 Kvolts com duração de 40 min.

Utilizou-se no processo de eletroforese capilar o polímero POP 4[™] (Applied Biosystems), tampão Genetic Analyzer Buffer com EDTA (Applied Biosystems), e capilar de 36 cm (Applied Biosystems). A coleta de dados foi realizada e as amostras foram analisadas com o programa Data Collection[®] versão 3.0 (Applied Biosystems), que capta a emissão fluorescente e a transfere para um conversor que reproduz a posição dos produtos de amplificação, e os alelos foram designados utilizando o programa GeneMapper[®] versão 3.2 (Applied Biosystems), pela identificação do tamanho de cada fragmento de fita simples (em pares de bases) e correlação dos fragmentos com os alelos da escada alélica (Chatterji e Pachter, 2006).

3.6 ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS

Com os dados obtidos após a análise dos produtos de eletroforese, os mesmos foram compilados em haplótipos de Y-STR os quais foram analisados e classificados quanto ao número de *loci* amplificados.

No intuito dos haplótipos serem informativos (Wolf et al, 2005) para confronto futuro em banco de dados de Y-STR, a classificação adotada neste trabalho considerou como haplótipo mínimo o conjunto de STR do cromossomo Y

preconizado pelo CODIS, contendo a presença de onze (11) marcadores (DYS389 I, DYS389 II, DYS392, DYS393, DYS438, DYS390, DYS19, DYS385 I/II, DYS391, DYS439).

O haplótipo das amostras que apresentaram os marcadores do haplótipo mínimo (11 Y-STR) e os demais marcadores moleculares analisados e presentes no sistema multiplex comercial (DYS456, DYS458, DYS635, Y_GATA_H4, DYS437 e DYS448) foram considerados como haplótipo completo.

As amostras que não tiveram a amplificação de um ou mais marcadores moleculares descritos no haplótipo mínimo (11 Y-STR) acima, foram designados como haplótipo incompleto.

4 RESULTADOS

Os resultados foram divididos para apresentação em: caracterização das amostras analisadas, exame de triagem e análise molecular.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS

Dezenove (19) casos de crimes sexuais foram analisados, totalizando vinte (20) vítimas. A idade das vítimas variou de 11 meses a 81 anos, não foi informada a idade da vítima do caso 9; todas as vítimas são do sexo feminino e em cada caso, segundo os relatos, houve um (01) único agressor, bem como no caso 19 que envolveu duas vítimas e foi informado um (01) agressor em comum. Somente uma das vítimas informou que tinha parceiro sexual consentido (caso 5) e, outra vítima, informou que havia realizado higiene íntima com uso de ducha vaginal (caso 2). No caso 14, as amostras tanto de secreção vaginal, quanto de secreção peniana, foram consideradas amostras questionadas; o suspeito não foi encaminhado para coleta de amostra de referência com consentimento informado.

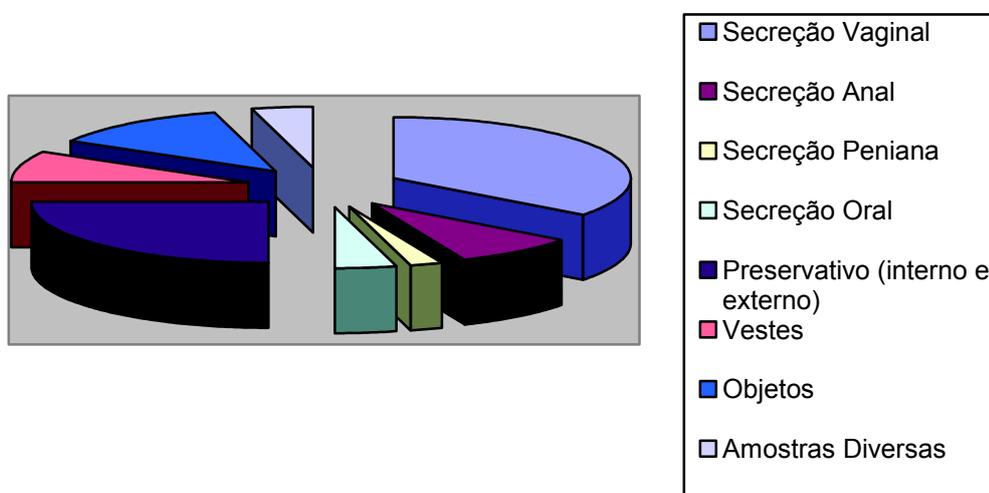
A amostra controle (caso 1) é uma amostra de secreção vaginal a qual, em 2005, foi submetida ao método de extração orgânica (fenol/clorofórmio), quantificada pela PCR em tempo real com o *kit* Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification (Applied Biosystems) para a pesquisa de DNA masculino, amplificada com o *kit* AmpFISTR® Yfiler® (Applied Biosystems) para 17 Y-STR, cujo produto da PCR foi separado por eletroforese capilar no analisador genético ABI 3130 Avant® (Applied Biosystems) e obteve quatorze (14) *loci* Y-STR detectados, apresentando o seguinte resultado: DYS456 (16), DYS389 I (não detectado), DYS390 (23), DYS389 II (não detectado), DYS458 (18), DYS19 (14), DYS385 I / II (12 / 14), DYS393 (13), DYS391(11), DYS439 (12), DYS635 (23), DYS392 (13), Y-GATA-H4 (não detectado), DYS437 (15), DYS438 (12) e DYS448 (18).

Quanto aos exames preliminares realizados pelo NMLAF/IC, a pesquisa de sêmen realizada apresentou os seguintes resultados: a pesquisa de espermatozoides foi positiva em 25% das amostras, negativa em 50% e, em 25% das amostras não constam resultados nos registros analisados; já a pesquisa de fosfatase ácida prostática resultou em 30% de positividade, 30% de negatividade, 25% não constam nos registros e, em 15% dos casos há relatos de que a pesquisa não foi realizada por insuficiência de reagentes.

A quantidade de vestígios por caso mostrou-se variada em função do *modus operandi* do agressor, contendo amostras coletadas do corpo das vítimas (no exame de corpo de delito de conjunção carnal) e amostras coletadas nas cenas de crime. Por exemplo, no caso 7 no exame de corpo de delito de conjunção carnal não foi constatada a presença de sinais externos de violência no corpo da vítima, mas a pesquisa de sêmen detectou a presença de espermatozoides; no caso 9 a vítima relatou o uso de preservativo por parte do agressor, este foi coletado na cena do crime, por perito criminal, e encaminhado para análise; já no caso 13 a vítima relatou não haver conjunção carnal, contudo relata que o agressor ejaculou em suas vestes, as quais foram apreendidas por meio do termo de busca e apreensão de objetos.

Neste trabalho, as quarenta e oito (48) amostras selecionadas para análise apresentam a seguinte distribuição: secreção vaginal 35,4%, secreção anal 8,3%, secreção peniana 2,1%, secreção oral 4,2%, preservativo (lados interno e externo) 25%, vestes 8,3%, objetos 12,5% e amostras diversas 4,2% (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição do tipo de amostra selecionada para extração de DNA.



4.2 EXAME DE TRIAGEM

O recurso da luz forense nas vestes e objetos possibilitou a pesquisa de manchas latentes com possibilidade de conter material biológico para a extração do DNA.

4.3 ANÁLISE MOLECULAR

4.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração diferencial foi realizada em quarenta e quatro (44) amostras representando 91,7% e caracterizando a maioria das extrações por esta metodologia. Em quatro (04) amostras utilizou-se a extração orgânica, que correspondeu a 8,3%.

Do total das quarenta e oito (48) amostras, doze (12) necessitaram de um procedimento de re-extração, correspondendo a 25% das amostras. Foi realizada a extração diferencial com o *kit* Differex[®] System (PROMEGA) e DNAIQ[™] System (PROMEGA), nas seguintes amostras: 02.Q1, 03.Q1, 03.Q2, 04.Q1, 05.Q1, 06.Q3, 07.Q1, 09.Q1a, 10.Q2, 11.Q5, 16.Q4c, 17.Q1.

Os resultados da re-extração se confirmaram em sua grande totalidade, pois nas amostras que na primeira extração diferencial não houve a detecção de DNA masculino, o segundo procedimento também não detectou, bem como naquelas amostras em que foi detectada uma baixa concentração o resultado foi confirmado.

As amostras extraídas pelo método diferencial originaram duas frações distintas, fração espermatozoide (FE) a qual se espera encontrar perfil molecular masculino e a fração não-espermatozoide (FNE) a qual se espera encontrar o perfil molecular feminino. Portanto, das quarenta e quatro (44) amostras, obtivemos

oitenta e oito (88) produtos de extração, sendo quarenta e quatro frações espermatozoide (FE) e quarenta e quatro frações não-espermatozoide (FNE).

As extrações diferencial (n= 88) e orgânica (n= 4) totalizaram noventa e dois (92) produtos de extração que seguiram para quantificação.

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os dados obtidos na quantificação da PCR em tempo real (Tabela 3) demonstraram que na extração diferencial a concentração de DNA masculino (Y) foi variada em ambas as frações FE e FNE. A fração espermatozoide variou de $1,92 \times 10^{-4}$ ng/ μ L a 6,57 ng/ μ L, enquanto que a fração não espermatozoide variou de $1,24 \times 10^{-4}$ ng/ μ L a 159 ng/ μ L. Já, na extração orgânica, utilizada para manchas de amostras biológicas, a concentração variou de $2,12 \times 10^{-3}$ ng/ μ L a $3,32 \times 10^{-2}$ ng/ μ L.

A detecção de DNA masculino foi efetiva na maioria das amostras analisadas, sendo evidenciada em 62,0% das amostras extraídas, já em 38,0% das amostras não foi detectada a presença de DNA masculino. Nas amostras contendo DNA masculino, 28,3% foi evidenciado na fração espermatozoide, 29,4% foi evidenciado na fração não espermatozoide e 4,3% foi obtido na extração orgânica (Gráfico 2).

As amostras 06.Q3 e 11.Q2 apresentaram DNA masculino somente na FNE em quantidade ínfima e a amostra 14.Q1 apresentou DNA masculino somente na FE.

A razão entre as concentrações de DNA autossômico e de DNA masculino ([AUTO] / [Y]), demonstrada no Gráfico 3, evidenciou que na extração diferencial, na FE, das vinte e seis (26) amostras com DNA masculino (Y) detectado, quinze (15) sugerem conter DNA de fonte única ([AUTO]/[Y] = 0,4 a 2,0) e quatro (04) sugerem a presença de mistura ([AUTO] / [Y] \geq 5,0) de DNA feminino e masculino. Na FNE, das vinte e sete (27) amostras com DNA masculino (Y), sete (07) sugerem conter DNA de fonte única, e doze (12) sugerem a presença de mistura, sendo que as amostras 14.Q2 FNE e 15.Q9 FNE apresentaram a razão [AUTO] / [Y] de mistura de DNA feminino e masculino mais elevada tendo sido detectado DNA masculino na concentração de 0,000415 ng/ μ l e 0,000943 ng/ μ l respectivamente. Quanto a extração orgânica, as quatro (04) amostras detectaram DNA masculino, uma (01)

amostra foi sugestiva de fonte única e duas (02) de mistura. As demais amostras foram consideradas indeterminadas quanto a ausência ou presença de mistura.

Tabela 3. Quantificação de DNA masculino e a relação entre a concentração de DNA autossômico e a concentração de DNA masculino (Y) nos produtos de Extração Diferencial – fração espermatozoide (FE) e fração não espermatozoide (FNE) – e nos produtos de Extração Orgânica por amostra.

AMOSTRA QUESTIONADA	QUANTIFICAÇÃO – PCR EM TEMPO REAL - CONCENTRAÇÃO (ng/μl)					
	EXTRAÇÃO DIFERENCIAL				EXTRAÇÃO ORGÂNICA	
	FE		FNE		Y	AUTOSSOMICO/ Y
	Y	AUTOSSOMICO/ Y	Y	AUTOSSOMICO/ Y		
01.Q1	$6,35 \times 10^{-3}$	1,3	$1,23 \times 10^{-2}$	3,9	NR	NR
02.Q1	ND	ND	ND	ND	NR	NR
03.Q1	ND	ND	ND	ND	NR	NR
03.Q2	ND	ND	ND	ND	NR	NR
03.Q3a	NR	NR	NR	NR	$2,45 \times 10^{-3}$	1,5
03.Q3b	NR	NR	NR	NR	$2,12 \times 10^{-3}$	2,9
04.Q1	$1,80 \times 10^{-2}$	0,7	$4,67 \times 10^{-2}$	21,9	NR	NR
05.Q1	$9,99 \times 10^{-4}$	6,4	$1,72 \times 10^{-3}$	23,3	NR	NR
06.Q1a	5,98	1,8	12,1	1,8	NR	NR
06.Q1b	$7,54 \times 10^{-3}$	3,2	$6,60 \times 10^{-4}$	80,1	NR	NR
06.Q3	ND	ND	$1,24 \times 10^{-4}$	1471,8	NR	NR
07.Q1	ND	ND	ND	ND	NR	NR
08.Q1	ND	ND	ND	ND	NR	NR
08.Q2	ND	ND	ND	ND	NR	NR
08.Q3	ND	ND	ND	ND	NR	NR
08.Q4a	ND	ND	ND	ND	NR	NR
08.Q4b	ND	ND	ND	ND	NR	NR
08.Q4c	ND	ND	ND	ND	NR	NR
09.Q1a	$9,91 \times 10^{-4}$	1,7	$1,69 \times 10^{-3}$	108,6	NR	NR
09.Q1b	$1,31 \times 10^{-3}$	1,8	$2,07 \times 10^{-3}$	67,4	NR	NR
10.Q1	ND	ND	ND	ND	NR	NR
10.Q2	$1,40 \times 10^{-3}$	3,9	$1,54 \times 10^{-3}$	777,8	NR	NR
11.Q2	ND	ND	$6,16 \times 10^{-4}$	12,0	NR	NR
11.Q3	$2,99 \times 10^{-4}$	1,2	$1,29 \times 10^{-2}$	2,4	NR	NR
11.Q5	ND	ND	ND	ND	NR	NR
12.Q1a	$2,87 \times 10^{-3}$	2,4	$1,47 \times 10^{-2}$	22,3	NR	NR
12.Q1b	6,57	1,2	159	1,9	NR	NR
12.Q2a	$3,48 \times 10^{-3}$	2,1	$1,49 \times 10^{-2}$	22,4	NR	NR
12.Q2b	$4,67 \times 10^{-2}$	1,9	$2,04 \times 10^{-1}$	3,7	NR	NR
12.Q3	NR	NR	NR	NR	$2,91 \times 10^{-2}$	6,2
12.Q4	NR	NR	NR	NR	$3,32 \times 10^{-2}$	8,2
13.Q1	$3,49 \times 10^{-2}$	2,2	$1,06 \times 10^{-2}$	2,7	NR	NR
13.Q2	$9,92 \times 10^{-2}$	2,6	$8,68 \times 10^{-3}$	2,3	NR	NR
14.Q1	4,15	1,6	ND	ND	NR	NR
14.Q2	$1,40 \times 10^{-3}$	5,1	$4,15 \times 10^{-4}$	10581,2	NR	NR
14.Q3	3,99	1,0	68,6	1,1	NR	NR
15.Q1	$4,65 \times 10^{-2}$	0,6	$2,05 \times 10^{-1}$	3,6	NR	NR
15.Q5c	$1,92 \times 10^{-4}$	1,0	$5,76 \times 10^{-2}$	1,3	NR	NR
15.Q9	$5,60 \times 10^{-4}$	5,1	$9,43 \times 10^{-4}$	41734,4	NR	NR
16.Q2	ND	ND	ND	ND	NR	NR
16.Q4a	$1,89 \times 10^{-2}$	1,4	$1,69 \times 10^{-2}$	1,2	NR	NR
16.Q4b	$9,83 \times 10^{-4}$	8,4	$5,16 \times 10^{-4}$	2,8	NR	NR
16.Q4c	$9,08 \times 10^{-4}$	3,5	$1,73 \times 10^{-3}$	1,3	NR	NR
17.Q1	ND	ND	ND	ND	NR	NR
18.Q1	ND	ND	ND	ND	NR	NR
18.Q1a	ND	ND	ND	ND	NR	NR
19.Q1a	$4,95 \times 10^{-2}$	1,8	2,20	4,2	NR	NR
19.Q1b	$4,75 \times 10^{-1}$	1,6	12,4	1,8	NR	NR

Legenda: ND – não detectado; NR – não realizado.

Gráfico 2. Quantificação das amostras de DNA extraídas pelas metodologias diferencial e orgânica.

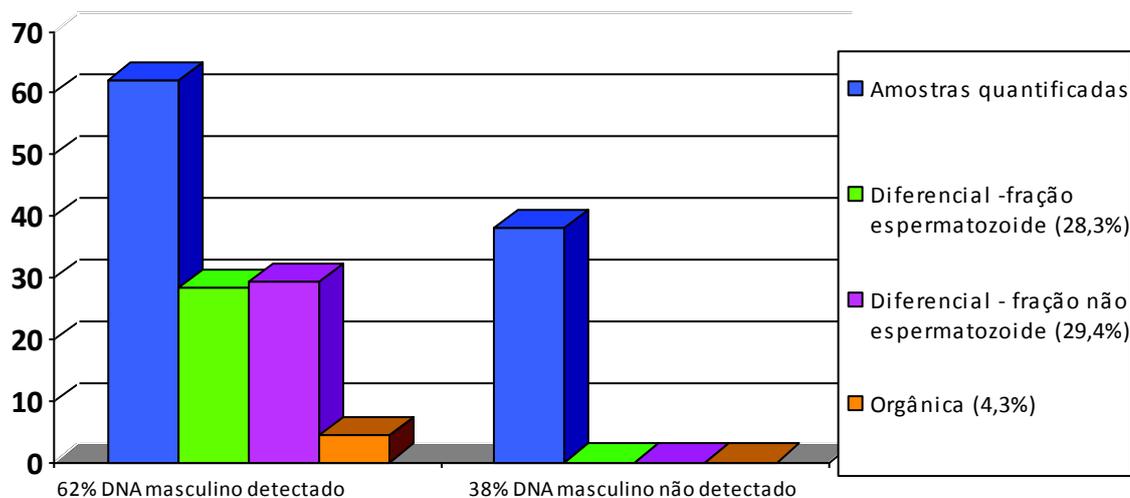
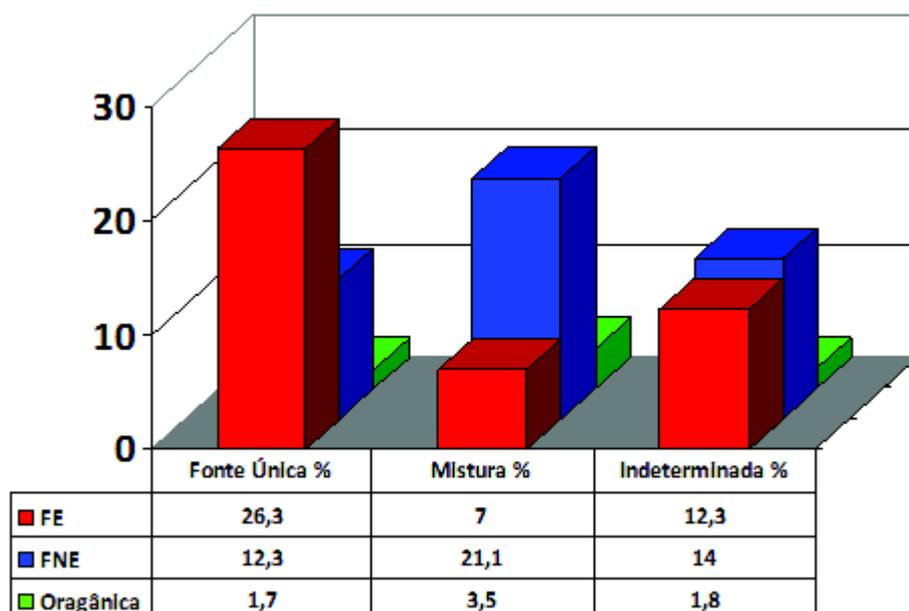


Gráfico 3. Razão entre as concentrações de DNA autossômico e de DNA masculino ([AUTO]/[Y]) detectada como fonte única, mistura e indeterminada na quantificação dos produtos de extração da Fração Espermatozoide (FE), da Fração Não Espermatozoide (FNE) e da Orgânica.



Das amostras quantificadas, dentre as que o DNA masculino foi detectado, vinte e uma (21) amostras foram selecionadas por não apresentarem inibidores (conforme resultado do IPC da PCR em tempo real) e por contemplarem, após procedimento de normalização, uma concentração de Y-DNA entre 0,1 ng a 1,25 ng/reação de amplificação de Y-STR, sendo: 01.Q1FNE (0,37 ng), 04.Q1FNE (1,16 ng), 05.Q1FNE (0,30 ng), 06.Q1aFNE (1,0 ng), 09.Q1bFNE (0,32 ng), 10.Q2FNE (0,11

ng), 11.Q2FNE (0,33 ng), 11.Q3FNE (0,39 ng), 12.Q1bFNE (1,0 ng), 12.Q2bFNE (1,0 ng), 12.Q3 (0,3 ng), 12.Q4 (0,3 ng), 13.Q1FE (0,9 ng), 13.Q2FE (1,0 ng), 14.Q1FE (1,0 ng), 14.Q3FE (1,0 ng), 15.Q1FNE (1,0 ng), 15.Q5cFNE (1,1 ng), 16.Q4aFNE (0,33 ng), 19.Q1aFNE (1,25 ng), 19.Q1bFE (1,0 ng).

Uma alíquota das amostras que prosseguiram para a amplificação de Y-STR foi armazenada, bem como o restante do produto de extração das demais amostras para a futura realização de PCR de marcadores STR autossômicos visando a individualidade genética do contribuinte masculino.

4.3.3 AMPLIFICAÇÃO DE Y-STR E DETECÇÃO DOS PRODUTOS

Das vinte e uma (21) amostras amplificadas pela PCR utilizando dezessete (17) marcadores moleculares do tipo STR situados no cromossomo Y e submetidas a eletroforese capilar, doze (12) apresentaram resultados. Os haplótipos obtidos encontram-se apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Haplótipos de Y-STR observados nas amostras de crimes sexuais.

AMOSTRA CÓDIGO	DYS 456	DYS 389 I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	DYS 385 I/II	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	YGATA H4	DYS 437	DYS 438	DYS 448
01.Q1 FNE	16	13	23	29	18	14	12 / 14	13	11	12	23	13	11	15	12	18
04.Q1 FNE	15	13	23	29	ND	14	14 / 17	12	10	11	21	ND	11	14	10	ND
05.Q1 FNE	14	12	23	ND	15	ND	ND / ND	13	10	ND	ND	ND	11	16	ND	ND
11.Q3 FNE	18	14	23	30	16	14	11 / 13	13	10	12	23	13	12	17	12	19
12.Q1b FNE	15	13	20	29	18	14	11 / 15	13	11	12	23	13	12	15	12	19
12.Q2b FNE	15	13	20	29	18	14	11 / 15	13	11	12	23	13	12	15	12	19
13.Q1FE	15	14	23	30	16	13	12 / 13	13	10	13	22	14	12	14	10	19
13.Q2 FE	15	14	23	30	16	13	12 / 13	13	10	13	22	14	12	14	10	19
14.Q1 FE	14	12	23	29	15	14	14 / 15	13	10	12	22	11	11	16	10	20
14.Q3 FE	14	12	23	29	15	14	14 / 15	13	10	12	22	11	11	16	10	20
15.Q1 FNE	17	13	24	30	15	13	17 / 18	13	10	12	22	11	13	14	10	20
15.Q5c FNE	17	13	24	30	15	13	17 / 18	13	10	12	22	11	13	14	10	20

Nota: (FE) Fração Espermatozoide; (FNE) Fração Não Espermatozoide; (ND) Não Detectado.

As amostras submetidas à amplificação apresentavam uma concentração bem variada, atendendo o intervalo pré-estabelecido neste trabalho na faixa de 0,1 ng a 1,25 ng/reação de amplificação de Y-STR (Gráfico 4). As doze amostras corresponderam a 57,1% das amostras amplificadas e continham DNA masculino na concentração de 0,30 ng a 1,16 ng/reação de amplificação de Y-STR. Já as nove (9) amostras sem detecção de Y-STR correspondem a 42,9% e estavam em uma concentração de 0,11 ng a 1,25 ng/ reação de amplificação de Y-STR.

A amostra 05.Q1FNE (Figura 4, eletroferograma codificado como Y04), que estava na concentração 0,30 ng/reação de PCR, obteve resultado em oito dos dezessete *loci* do sistema multiplex, ou seja, mesmo estando abaixo da sensibilidade mínima preconizada pelo fabricante do kit (0,5 ng/ μ L) obteve resultado parcial com a detecção dos *loci* com até 200 (duzentos) pares de bases. Nos 8 *loci* detectados apresentou os mesmos alelos das amostras 14.Q1FE e 14.Q3FE.

A amostra controle 01.Q1FNE (Figura 5, eletroferograma codificado como Y06), na concentração em 0,37 ng/reação de PCR, apresentou resultado nos dezessete *loci* analisados, sendo que em 2005 haviam sido detectados quatorze *loci*. Contudo, apresenta um declínio quanto à detecção do sinal eletroforético nos alelos detectados nos *loci* acima de 200 pares de bases.

Gráfico 4. Amostras contendo DNA masculino na concentração de 0,1 a 1,25 ng /reação de PCR submetidas à amplificação por Y-STR.

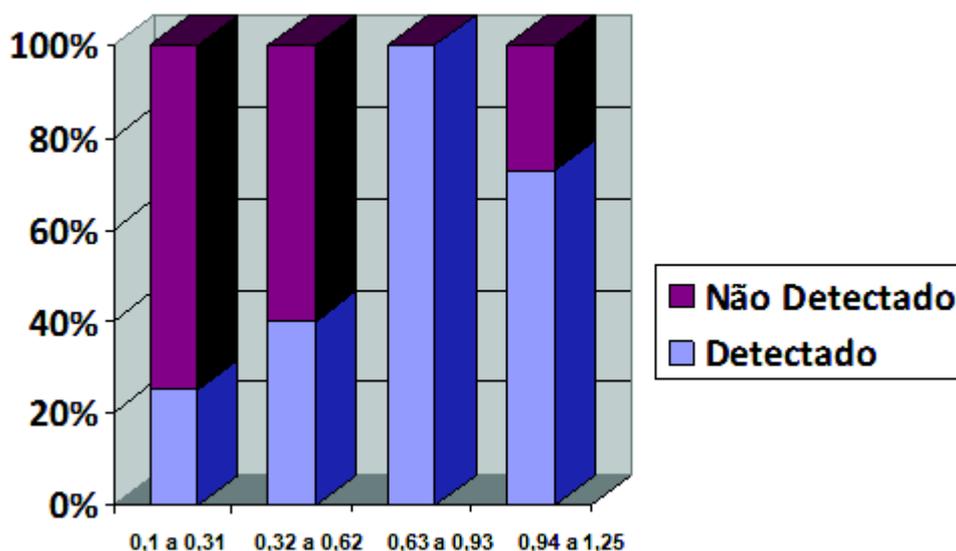


Figura 4. Perfil eletroforético de Y-STR ilustrando a amplificação de 8 *loci* na concentração de 0,30 ng/reação de PCR.

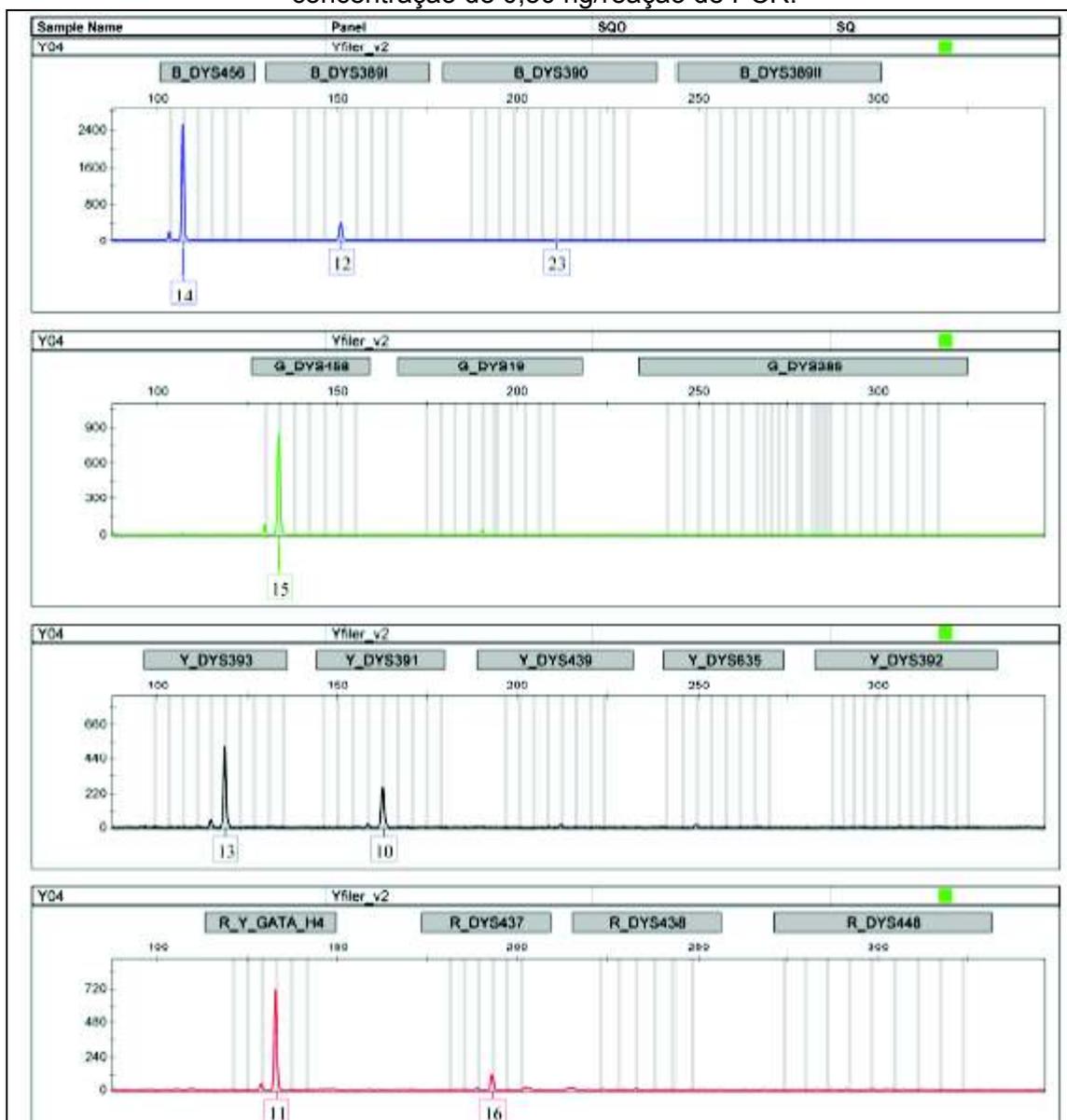
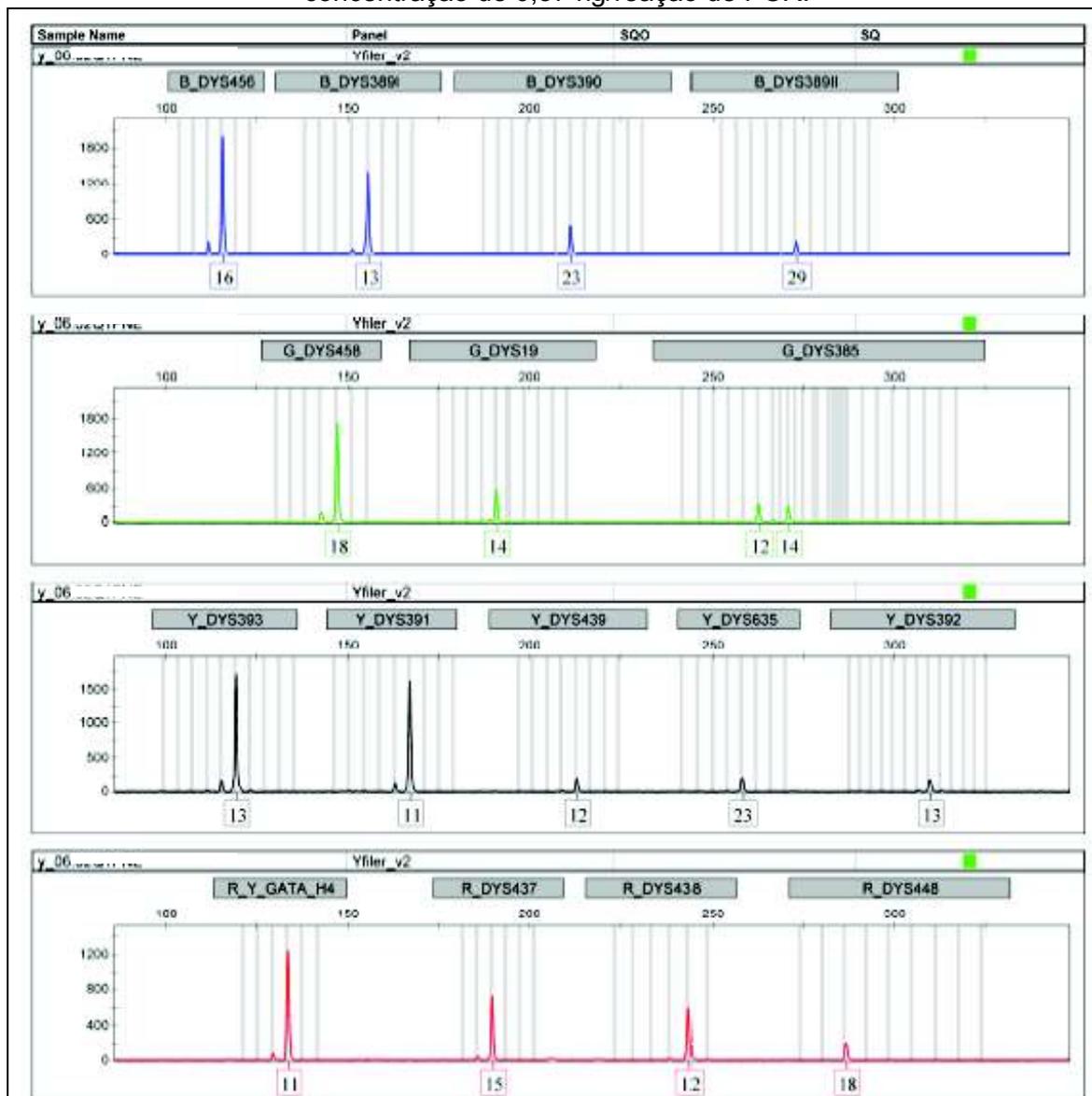


Figura 5. Perfil eletroforético de Y-STR ilustrando a amplificação de 17 loci na concentração de 0,37 ng/reação de PCR.



4.3.4 ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS

Os haplótipos obtidos nas amostras 01.Q1FNE, 04.Q1FNE, 05.Q1FNE, 11.Q3FNE, 12.Q1bFNE, 12.Q2bFNE, 13.Q1FE, 13.Q2FE, 14.Q1FE, 14.Q3FE, 15.Q1FNE e 15.Q5cFNE foram classificados (Tabela 5), de acordo com o critério

apresentado: 1) haplótipo mínimo com onze marcadores Y-STR preconizados no CODIS; 2) haplótipo completo com dezessete marcadores do conjunto multiplex utilizado no presente trabalho; e 3) haplótipo incompleto com a não detecção de um ou mais *loci* do haplótipo mínimo (11 Y-STR).

Tabela 5. Classificação dos haplótipos de Y-STR evidenciados.

Amplificação	Quantidade encontrada	Total (%)
Haplótipo Mínimo e Completo	10	83,3
Haplótipo Incompleto	02	16,7

Quanto a classificação, dez haplótipos foram classificados tanto como haplótipo mínimo, quanto haplótipo completo, por apresentarem os onze Y-STR preconizados pelo CODIS e os dezessete Y-STR do conjunto multiplex, correspondendo a 83,3% dos haplótipos evidenciados dos vestígios de crimes sexuais. Dois haplótipos foram classificados como haplótipo incompleto, correspondendo a 16,7%; nestes não foram detectados os seguintes *loci*: amostra 04.Q1FNE – DYS458, DYS392 e DYS448, e amostra 05.Q1FNE – DYS389 II, DYS19, DYS385 I/II, DYS439, DYS635, DYS392, DYS438 e DYS 448.

O haplótipo incompleto do caso 05, representado pelos oito *loci* detectados na amostra 05.Q1FNE, não foi suficientemente informativo para discriminá-lo dos haplótipos mínimo e completo das amostras 14.Q1FE e 14.Q3FE.

Os doze haplótipos obtidos apresentaram um único alelo em cada *locus*, caracterizando um único contribuinte masculino por *locus*, ou seja, ausência de mistura de DNA masculino.

Nos casos criminais 12, 13, 14 e 15, com mais de uma amostra analisada por caso (caso 12 – amostras 12.Q1bFNE e 12.Q2bFNE, caso 13 – amostras 13.Q1FE e 13.Q2FE, caso 14 – amostras 14.Q1FE e 14.Q3FE e caso 15 – amostras 15.Q1FNE e 15.Q5cFNE), os haplótipos obtidos em um mesmo caso e provenientes de amostras distintas foram confrontados (análise intra-caso) e demonstraram haver coincidência haplotípica, ou seja, ficou evidenciada a presença de um único haplótipo entre as amostras de um mesmo caso, configurando haver uma única contribuição uniparental masculina. Já, quando confrontados extra-caso, não foram observadas coincidências haplotípicas.

Dentre os dez (10) haplótipos mínimos e completos obtidos, seis (06) diferentes haplótipos foram identificados nos casos criminais 01, 11, 12, 13 14 e 15,

configurando haver contribuição uniparental masculina específica e diferente em cada caso criminal (Tabela 6).

Tabela 6. Haplótipos mínimos e completos do cromossomo Y obtidos por caso criminal.

CASO CRIMINAL	DYS 456	DYS 389 I	DYS 390	DYS 389 II	DYS 458	DYS 19	DYS 385 I/II	DYS 393	DYS 391	DYS 439	DYS 635	DYS 392	Y GATA-H4	DYS 437	DYS 438	DYS 448
CASO 1	16	13	23	29	18	14	12 / 14	13	11	12	23	13	11	15	12	18
CASO 11	18	14	23	30	16	14	11 / 13	13	10	12	23	13	12	17	12	19
CASO 12	15	13	20	29	18	14	11 / 15	13	11	12	23	13	12	15	12	19
CASO 13	15	14	23	30	16	13	12 / 13	13	10	13	22	14	12	14	10	19
CASO 14	14	12	23	29	15	14	14 / 15	13	10	12	22	11	11	16	10	20
CASO 15	17	13	24	30	15	13	17 / 18	13	10	12	22	11	13	14	10	20

No caso criminal 12, foram encontrados no local do crime, dois preservativos usados e, os mesmos foram recolhidos para análise e identificados como a seguir. A amostra 12.Q1bFNE – swab coletado de um preservativo masculino – lado interno e a amostra 12.Q2b FNE – swab coletado de um outro preservativo masculino – lado interno, apresentaram o mesmo perfil molecular, ou seja, o mesmo haplótipo do cromossomo Y, caracterizando que os preservativos foram usados pelo mesmo agressor ou por um indivíduo pertencente a mesma família.

No caso 13, segundo relato da vítima, o agressor ejaculou em suas vestes e ofereceu a flanela para a mesma se limpar. A vítima também relata que a saia foi lavada após o fato. As amostras foram identificadas como 13.Q1FE – flanela e 13.Q2FE – saia. Ambas as amostras apresentaram o mesmo perfil molecular confirmando o relato da vítima no presente caso.

O caso 14, as amostras identificadas como 14.Q1FE – swab de secreção vaginal e 14.Q3FE – swab de secreção peniana, mostraram-se idênticas quanto aos haplótipos do cromossomo Y obtidos.

As amostras do caso 15 (15.Q1FNE – short e amostra 15.Q5cFNE – colcha estampada floral) demonstraram coincidência de haplótipos do cromossomo Y tanto na veste que a vítima usava quanto na colcha da cama, que conforme relato, a vítima, ainda vestida, foi forçada a se deitar na cama estando o agressor sobre ela.

5 DISCUSSÃO

Os casos criminais do estado do Tocantins encontram-se sub-analisados em função do Instituto de Genética Forense (IGF) estar em implementação. As análises genéticas são realizadas em outros laboratórios oficiais do país, no âmbito da segurança pública, e há uma priorização de analisar os casos que se encontram “fechados”, ou seja, com amostras da vítima e/ou local de crime e do suspeito. Contudo, a aprovação da Lei nº 12.654 de 28 de maio de 2012 que institui a criação de banco de dados de perfis genéticos permite estabelecer uma nova realidade para os “casos abertos”, em específico os de crime sexual.

Os haplótipos de Y-STR obtidos das amostras questionadas poderão compor uma base de dados para confrontar com as demais amostras biológicas extraídas de vestígios de crimes diversos, de indivíduos suspeitos e condenados, possibilitando excluir ou incluir suspeitos, e assim corroborar na resolução dos crimes (Corte-Real, 2004; Lima, 2008; O’Donnell et al, 2008; Carracedo et al, 2010).

Este estudo mostra a diversidade de vestígios e suportes contendo amostras biológicas que podem ser analisadas nos laboratórios criminais com resultados efetivos conforme a coleta, o acondicionamento, a preservação e a análise das amostras. Das amostras analisadas, as secreções biológicas coletadas nos exames de corpo de delito de conjunção carnal foram as de maior incidência (O’Donnell et al, 2008).

A obtenção de informações junto à vítima torna-se de suma importância para a pesquisa de DNA; questões como a ocorrência de relação sexual com parceiro consentido em data anterior e próxima ao crime sexual e a realização de higiene corporal após a agressão (banho, higiene íntima com ducha) podem alterar um possível resultado esperado na análise molecular, bem como o número de agressores, a presença ou ausência de ejaculação, o uso de preservativos, o tempo decorrido entre a agressão e a coleta do material (Wolf et al, 2005; Lapeña, 2009).

A importância da vítima informar sobre a ocorrência de relação sexual com parceiro consentido está relacionada à obtenção de uma amostra de exclusão, pois o parceiro sexual deve ser orientado a doar amostra biológica para análise e

confronto de perfil genético com o obtido da amostra questionada coletada da vítima no exame de corpo de delito de conjunção carnal.

Dentre as vinte vítimas agredidas sexualmente, cujas amostras biológicas foram objeto deste estudo, não consta informação em dezoito delas quanto à realização de higiene íntima pós-agressão e anterior ao exame de corpo de delito de conjunção carnal. Apenas a vítima do caso 02 informou ter realizado higiene íntima, sendo que os exames preliminares para pesquisa de sêmen resultaram negativos e, as análises moleculares, mesmo tendo sido realizadas duas extrações diferenciais distintas, não detectaram DNA masculino na amostra de secreção vaginal analisada. Esta negatividade pode ser atribuída, de certa forma, à higienização íntima que pode ter comprometido a obtenção do material biológico a ser analisado e, como esta informação não está explícita nos demais casos, abre uma margem para se pesquisar o fato junto aos casos que o DNA masculino não foi detectado (Johnson et al, 2005).

Já a vítima do caso 03 informou não ter realizado higiene íntima, mas os exames preliminares foram negativos para a pesquisa de sêmen, bem como as análises moleculares não detectaram a presença de DNA masculino nas amostras de secreção vaginal e anal analisadas. Os resultados evidenciados podem estar relacionados a outras informações, anteriormente citadas, como a ocorrência ou não de ejaculação, o uso de preservativos, o tempo decorrido entre a agressão e a coleta do material biológico, que de acordo com Drezett et al (2011) “apenas uma pequena parcela das mulheres realiza o exame dentro do prazo adequado para a coleta de evidências (...)”. Tais informações não constam do formulário de encaminhamento da amostra biológica ao IGF e a persistência em reiniciar as análises moleculares pode permanecer com resultado improdutivo na detecção de DNA masculino.

Tomando o caso 05 como exemplo, a vítima informou ter parceiro sexual consentido e, diante desta informação, o haplótipo incompleto deve ser confrontado com o haplótipo do parceiro sexual com a finalidade de excluí-lo de ser o contribuinte do DNA masculino presente na amostra questionada.

Quanto aos exames de triagem para a pesquisa de sêmen, os dados moleculares mostram que eles não podem ser considerados como conclusivos e sim como indicativos; eles são necessários para nortear as possibilidades junto às análises moleculares. Por exemplo, considerando os perfis moleculares obtidos de

Y-STR, observamos que as amostras analisadas nos exames de triagem para a pesquisa de sêmen nos casos 01, 04 e 05, foram positivas para a presença de espermatozoides e fosfatase ácida. Portanto, a análise molecular confirmou os resultados dos exames de triagem. Entretanto, já nos casos 11, 14 e 15, a pesquisa de espermatozoides foi negativa, divergindo da análise molecular na qual foram obtidos perfis moleculares de Y-STR completos, corroborando com os estudos de Sibille et al (2002) e De Paula (2012). Diante de tais resultados não se deve excluir a possibilidade em obter DNA masculino de amostras com exames preliminares negativos, a análise molecular dos Y-STR pode atender o objetivo de estabelecer a autoria do crime sexual.

O sucesso da análise molecular está vinculado não somente aos fatores pré-analíticos mencionados, mas também aos analíticos e pós-analíticos. O processo analítico é preponderante para o sucesso da pesquisa; as metodologias de extração de DNA, amplificação do DNA masculino e eletroforese capilar utilizadas no presente estudo mostram eficiência nos resultados obtidos.

Nos casos de investigação de crime sexual, a extração diferencial torna-se necessária, pois separa o DNA masculino do feminino. Em uma coleta realizada no corpo da vítima (por exemplo, secreção vaginal) existe maior probabilidade de amplificação preferencial do material feminino em relação ao masculino (Chaudhary et al, 2010). Assim, a extração diferencial (e suas frações espermatozoide e não espermatozoide) aumenta a possibilidade de sucesso em obter o perfil molecular do agressor. Sendo detectado DNA masculino na fração espermatozoide, em uma concentração (ng) e volume (μ l) adequados para a análise molecular, este deve ser analisado por meio de marcadores moleculares microssatélites tanto para o cromossomo Y, quanto para os cromossomos autossômicos. Já a fração não espermatozoide, na existência de mistura de DNA feminino e masculino (pela presença de demais células no sêmen que não o espermatozoide), deve ser analisada com os marcadores Y-STR pela especificidade destes junto ao cromossomo Y, pois detectam o perfil molecular masculino presente na amostra mesmo estando elevada a concentração de DNA feminino. Conforme Garvin et al (2009), há casos criminais que sem a metodologia de extração diferencial a detecção do perfil de DNA masculino não tem tido sucesso.

Dentre as amostras submetidas à extração diferencial, doze (12) foram re-extraídas. O procedimento de extração diferencial inicialmente utilizado não resultou

na detecção de DNA masculino em algumas amostras analisadas, e a re-extração diferencial realizada com o *kit* comercial também não demonstrou uma eficiência superior ao primeiro procedimento. Esse resultado pode ser justificado pela escassez e qualidade das amostras forenses analisadas.

A quantificação realizada por meio da PCR em tempo real, tanto para DNA autossômico total, quanto para Y-DNA, estabeleceu a concentração de DNA nas amostras analisadas bem como a razão entre DNA autossômico e Y ($[AUTO] / [Y]$). Estes dados orientaram a utilização dos marcadores moleculares Y-STR e a concentração de DNA para a amplificação dos mesmos. A normalização da concentração das amostras que foram amplificadas para Y-STR ficou em uma faixa entre 0,1 ng a 1,25 ng/reação de PCR, para que a concentração mínima não configurasse amostra *Low Copy Number* (Budowle, 2010).

A metodologia de extração diferencial pôde ser analisada com os resultados da quantificação da PCR em tempo real. Os dados obtidos na fração espermatozoide e na fração não espermatozoide demonstram eficiência no método de lise diferencial na maioria das amostras extraídas. O DNA da vítima foi separado do DNA do agressor em mais de 50% das frações espermatozoide, obtendo DNA masculino de fonte única. As frações não espermatozoide que resultaram em misturas DNA feminino e masculino ampliaram as possibilidades de se obter um perfil de Y-STR, principalmente nos casos cujos exames preliminares resultaram negativos para a pesquisa de sêmen.

Quando os produtos de extração sugerem DNA masculino de fonte única, os marcadores Y-STR e STR autossômicos podem ser analisados. Por esta razão, as amostras extraídas foram preservadas para posterior análise molecular com marcadores microssatélites autossômicos.

Nos crimes sexuais, todos os produtos de extração de DNA (FE, FNE e orgânica) devem ser analisados com marcadores STR autossômicos e Y-STR, no entanto na existência de limitações técnicas (por exemplo, mistura feminino/masculino desbalanceada) é imperativo a realização da análise molecular com Y-STR (Roewer, 2009).

Os produtos de extração de DNA também puderam ser analisados quanto a presença de inibidores de PCR; o controle interno (IPC) da PCR em tempo real não evidenciou inibidores nas amostras que seguiram para a amplificação de Y-STR. A utilização da membrana de purificação Amicon®100K (Millipore) nas últimas etapas

do processo de extração, bem como o uso da resina magnética do DNAIQ™ System (PROMEGA) que tem afinidade específica à molécula de DNA, podem ter contribuído para minimizar tal fator.

Os haplótipos de Y-STR demonstraram que, em cada caso, a vítima foi agredida por um único indivíduo; esta informação é de grande valia no processo investigatório, bem como nos estudos vinculados à identificação humana. A detecção e identificação do componente masculino direciona o número de agressores.

Dentre os perfis eletroforéticos obtidos, sinais de degradação foram observados nas amostras 01.Q1FNE (caso1, amostra controle), 04.Q1FNE (caso 4) e 05.Q1FNE (caso 5). A amostra 01.Q1FNE, apesar da detecção dos 17 Y-STR, foi evidenciada a redução na intensidade do sinal eletroforético nos *loci* com mais de 200 pares de bases; e a as amostras 04.Q1FNE e 05.Q1FNE, independentemente das concentrações de DNA, mostraram resultados insatisfatórios com a obtenção de perfis de Y-STR parciais, houve redução do número de *loci* informativos com tamanhos acima de 200 pares de bases (Johnson et al, 2005). O processo de degradação pode gerar fragmentos quantificáveis, mas não amplificáveis, pois pode ser comprometida a região de anelamento do iniciador na sequência alvo do DNA a ser amplificada. As amostras em que não foram obtidos resultados para Y-STR podem ter sofrido degradação.

Nas amostras em que foi obtido perfil molecular completo houve uma grande variação na concentração do DNA amplificado, de 0,37 ng a 1,1 ng/ reação de PCR para Y-STR. Como exemplo, a amostra controle (01.Q1FNE do caso 01), que estava em uma concentração abaixo da sensibilidade preconizada no *kit*, mesmo apresentando sinais de degradação, resultou em um haplótipo de Y-STR completo.

Em 2005, na primeira análise da amostra 01.Q1FNE (caso 01) o método de extração foi o orgânico e, nesse trabalho, a extração diferencial. O resultado observado na primeira extração foi amplificado no mesmo sistema multiplex e obteve a amplificação de quatorze dos dezessete marcadores moleculares. Utilizando a extração diferencial e a normalização da concentração do DNA a ser amplificado, o resultado observado teve uma melhora com a amplificação de todos os marcadores do sistema multiplex, possibilitando a diferenciação do autor entre indivíduos do sexo masculino não-relacionados, que segundo Hirschfeld (2005) este sistema multiplex tem o poder de discriminação em torno de 98%.

Os avanços tecnológicos implementados à Genética Forense demonstram a grande capacidade em obter perfis genéticos de amostras biológicas contendo pouco DNA (abaixo de 0,5 ng/ reação de PCR) e armazenadas por longo tempo, mas é importante que as coletas dos vestígios de local de crime e de corpo de delito sejam realizadas não somente com o objetivo da obtenção do vestígio, mas sim com o objetivo de minimizar o processo de degradação das amostras forenses para a obtenção de resultados mais informativos.

Ao ser utilizada na rotina dos laboratórios forenses a análise de Y-STR, busque obter um haplótipo que possua a habilidade em discriminar dois indivíduos do sexo masculino e não relacionados pela linhagem patrilinear. Os haplótipos de Y-STR classificados como completos neste trabalho, compostos pelos 17 Y-STR do conjunto multiplex utilizado, possuem esta característica (Hanson e Ballantyne, 2007) a qual também foi evidenciada por Palha et al (2012) em seus estudos, que utilizando um conjunto multiplex de 14 Y-STR obteve parâmetros similares quanto a capacidade de discriminação do conjunto de 17 Y-STR e um aumento desta capacidade de discriminação quando comparou os resultados dos 14 Y-STR com o haplótipo mínimo de 9 Y-STR estabelecido pela ISGF (Sociedade Internacional de Genética Forense, do inglês *International Society of Forensic Genetics*).

Neste trabalho, os haplótipos de Y-STR foram classificados como completo, mínimo e incompleto no intuito da obtenção de haplótipos informativos com capacidade de discriminação. Os haplótipos completos, com 17 Y-STR, evidenciaram que o acréscimo de marcadores moleculares polimórficos de Y-STR em uma dada análise torna o haplótipo mais informativo e aumenta a habilidade em discriminar indivíduos do sexo masculino, não relacionados; reafirmando a importância da análise molecular destes marcadores nos crimes sexuais.

As amostras que apresentaram haplótipos incompletos de Y-STR devem ser interpretadas com cautela quanto a inclusão de suspeitos em um dado crime. A conclusão desses casos pode ser comprometida utilizando-se somente os marcadores Y-STR, mas é certo que esses marcadores podem auxiliar na exclusão de suspeitos. Como foram armazenadas alíquotas de amostras biológicas para futura análise, far-se-á necessário, nesses casos, a análise de outros marcadores moleculares STR autossômicos para melhorar o poder de discriminação (Sibille et al, 2002; Cerri et al, 2003; De Paula, 2011).

O confronto de haplótipos intra e entre os casos, proposto neste estudo, foi de grande valia, pois os resultados obtidos apontam que as agressões sexuais foram cometidas por um único indivíduo em cada caso, ou seja, os eventos são indivíduos específicos e não caracterizam crimes em série cometidos por um único autor.

A análise de casos abertos (ou seja, das amostras questionadas) amplia a possibilidade de resolução dos crimes sexuais como observado no caso 14, em que duas amostras de natureza distinta (secreção vaginal e secreção peniana) apresentaram um haplótipo de contribuinte masculino único, não havendo mistura de DNA masculino. O confronto dos haplótipos intra caso permitiu estabelecer que o haplótipo de Y-STR detectado na amostra biológica coletada na vítima coincidia com o haplótipo de Y-STR obtido da secreção peniana e a autoria do delito ficou evidenciada por meio das amostras questionadas.

O exame de DNA é utilizado também para a exclusão de indivíduos falsamente acusados. No caso de uma investigação criminal, o exame de DNA faz parte do conjunto probante, ou seja, são consideradas outras provas (histórico, dados da investigação, provas testemunhais, etc.) para a conclusão do inquérito policial.

O presente trabalho corrobora com a necessidade dos laboratórios de genética forense iniciarem a análise de amostras biológicas de crimes introduzindo os perfis genéticos obtidos em um banco de dados. A legalização na obtenção das amostras de referência de condenados e suspeitos, estabelecida na legislação brasileira, permitirá a realização de confrontos na busca de coincidência entre a amostra questionada e o provável autor, gerando respostas seguras para incluir um suspeito ou excluir suspeitos inocentes.

A inclusão de haplótipos Y-STR no banco de dados de perfis genéticos permite direcionar uma investigação criminal. No que tange aos crimes sexuais, pode ser a informação que irá proporcionar a materialidade do fato que até então não contava com uma prova científica, ou seja, uma prova pericial.

A inserção dos haplótipos de Y-STR de amostras questionadas em banco de dados de perfis Y-STR carece de regulamentação. Observa-se que a legislação brasileira que trata do banco de dados de perfis genéticos de cunho criminal inclui como doadores os condenados por crimes sexuais, visto serem crimes hediondos. Assim, torna-se necessário definir quais marcadores Y-STR irão compor o haplótipo a ser inserido no banco de dados, bem como regras de coincidência haplotípica e normas que garantam a qualidade dos resultados para confronto.

6 CONCLUSÃO

Diante da diversidade das amostras analisadas e considerando o objetivo proposto neste trabalho, a obtenção dos perfis moleculares de Y-STR constitui uma ferramenta eficaz no direcionamento das investigações e elucidação dos crimes sexuais, contribuindo para a celeridade dos processos judiciais.

Contudo, neste trabalho, não foi possível estabelecer o perfil de Y-STR para todas as amostras analisadas. A qualidade, a baixa concentração e a degradação do DNA masculino, assim como a presença de inibidores, foram fatores limitantes para atingir o objetivo proposto, bem como a escassez das amostras biológicas cujos produtos de extração foram destinados a futura análise com marcadores microssatélites STR autossômicos.

O uso de marcadores Y-STR está consolidado na genética forense e a utilização de kits comerciais validados para uso em amostras forenses facilita a análise simultânea de vários marcadores microssatélites. A inerente especificidade desses marcadores ao cromossomo Y permite detectar o componente masculino. Nos crimes sexuais é especialmente útil para estabelecer o número de agressores, evidenciar o componente masculino em indivíduos azoospermicos, oligospermicos, vasectomizados e em misturas de DNA feminino/masculino quando o DNA feminino está em maior proporção e, diferenciar misturas de DNA masculino/masculino entre contribuintes não aparentados.

A extração diferencial corroborou para a obtenção de perfil molecular contendo DNA masculino livre de DNA feminino. Os resultados apresentados evidenciaram que na fração espermatozoide, em sua maioria, foi detectado DNA masculino de fonte única, disponibilizando amostra livre de mistura para a pesquisa DNA autossômico e Y-STR. Já, na fração não espermatozoide, o resultado obtido em grande parte foi de mistura DNA feminino/masculino, direcionando a busca do componente masculino por meio dos marcadores Y-STR. Não se pode deixar de mencionar a ocorrência de DNA sugestivo de mistura na fração espermatozoide, provavelmente esta mistura deve ter ocorrido em razão do carreamento de DNA lisado na etapa inicial da extração diferencial; fato inverso foi observado na fração

não espermatozoide que apresentou DNA sugestivo de fonte única, que considerando a natureza dos vestígios, especificamente os preservativos que na coleta com *swab* produziram amostras do lado interno e externo, este resultado era esperado. Uma pequena parcela da fração espermatozoide e da fração não espermatozoide foi caracterizada como fonte indeterminada, necessitando da análise com marcadores microssatélites STR autossômicos para dirimir esta questão em estudo futuro.

Diante das amostras analisadas com os marcadores Y-STR, o perfil masculino obtido permitiu estabelecer o número de contribuintes. Cada amostra questionada evidenciou o padrão haplotípico alelo único em cada um dos *loci* analisados, afastando a possibilidade da ocorrência de mistura de DNA masculino. Pode-se então afirmar que os perfis haplotípicos obtidos neste trabalho foram provenientes de contribuintes masculinos únicos, ou seja, o haplótipo de Y-STR detectado em cada amostra questionada foi gerado por um contribuinte masculino.

Alguns dos casos de crime sexual analisados continham mais de uma amostra questionada com resultado de Y-STR, estes foram confrontados entre si e a coincidência haplotípica foi estabelecida apontando o mesmo contribuinte masculino; em cada caso o delito foi perpetrado por um único agressor. Posteriormente, ao serem confrontados entre os casos, ficou evidenciado que o haplótipo de Y-STR obtido em cada caso era proveniente de contribuintes masculinos distintos, não havendo coincidência haplotípica, permitindo concluir que não se tratava de crimes sexuais em série.

É de fácil reconhecimento a importância que o haplótipo de Y-STR assume nas análises de crimes sexuais como prova pericial, principalmente quando este se torna a única informação genética do agressor a ser obtida de amostras questionadas. Contudo o haplótipo tem que ser informativo a ponto de discriminar indivíduos não relacionados pela linhagem patrilinear. Os resultados apresentados neste estudo demonstraram a importância de serem analisados o maior número de marcadores polimórficos Y-STR para compor um haplótipo informativo.

É grande o número de marcadores polimórficos Y-STR disponíveis para análise, contudo para o uso forense, em se tratando na maioria dos casos de amostras únicas e com pouco material biológico, deve-se dar preferência a conjuntos multiplex que amplificam simultaneamente vários *loci*, a exemplo do

utilizado neste estudo, contendo marcadores polimórficos com produtos de até 200 pares de bases.

O avanço tecnológico vem contribuindo sobremaneira com o segmento da genética forense proporcionando perfis genéticos mais informativos. Os marcadores moleculares de Y-STR corroboram com esta realidade.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGUIAR S. M., ALBUQUERQUE T. C. K., BITTENCOURT E. A. A., DE OLIVEIRA J. P. S. C., FAGUNDES P. R., JACQUES G. S., KOSHIKENE D., LIMA H. B., MALAGHINI M., MOREIRA A. P. D. M., SILA J. S. F. P., WELTER A. C. **Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos e a implantação do CODIS no Brasil.** Resumo. III Congresso Brasileiro de Genética Forense, II Jornada Latino Americana de Genética Forense. PUCRS, Porto Alegre-RS. 2011.

ALHO, C. S. **Dinâmica dos Genes e Medicina Genômica.** In: MIR, Luís (Org.). *Genômica.* São Paulo: Atheneu, 1ª ed., p. 76-9. 2004.

ALVES E. G. R. **Direitos Fundamentais – Limitações Necessárias: Aplicação do Exame Pericial do DNA para a Identificação de Pessoas.** Monografia [Lato Sensu] Pós Graduação em Ordem Jurídica e Ministério Público. Fundação Escola Superior do Ministério Público do Distrito Federal e Territórios, Brasília-DF. 2009.

BALLONE G. J., ORTOLANI I. V., MOURA, E. C. **Violência Doméstica.** In: PsiqWeb. 2003 revisto em 2008. [acessado em 23 jun 2012]. Disponível em: www.psiqweb.med.br

BARROS L. R. S. M., BIROL A. P. J. **Crime de Estupro e sua Vítima: a discriminação da mulher na aplicação de pena.** [s.d.]. [acessado em 23 jun 2012]. Disponível em: <http://www.mulhercidadania.al.gov.br/cavcrime/artigos/Crime%20de%20Estupro%20e%20Sua%20Vitima%20-%20A%20Discricao%20da%20Mulher%20na%20Aplicacao%20da%20Pena.pdf>

BRASIL. **Lei nº 12.037 de 1º de outubro de 2009**, parágrafo 1º, art. 5º-A. 2009.

BUDOWLE B., BAECHTEL F.S., COMEY C.T., GIUSTI A.M., KLEVAN L. **Simple Protocols for Typing Forensic Biological Evidence: chemiluminescent detection for human DNA quantitation and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses and manual typing of polymerase chain reaction (PCR) amplified polymorphisms.** *Electrophoresis*, v. 16, n. 9, p. 1559-67. 1995.

BUDOWLE B. **Molecular Diagnostics.** Elsevier, 2ª ed., 2010.

BUTLER J. M. **Y-STRs: Markers, Mutations and More**. 2007. [acessado em 10 nov 2011]. Disponível em: <http://www.cste.nist.gov/strbase/pubpres/y-strscadoj march2007.pdf>

CARRACEDO A., SALAS A., LAREU M. V. **Problemas y Restos de Futuro de La Genética Forense en el Siglo XXI**. Revisão. Cuadernos de Medicina Forense, v. 16, n. 1-2, p. 31-5. 2010.

CARVALHO B. A. **Exames Presuntivos para Detecção de Fluidos Biológicos**. Instituto Geral de Perícias. Porto Alegre-RS. [s.d.].

CASOY I., SALDIVA H. N., PONTES, M. B. R., JÚNIOR A. M. **Criação de Unidade Especializada em Coleta de Vestígios em DNA e Padrões de Comportamento do Assassino Sexual**. 2011. [acessado em 22 nov 2011]. Disponível em: <http://serialkiller.com.br/?p=313>

CERRI N., RICCI U., SANI I., VERZELETTI A., DE FERRARI F. **Mixed Stains From Sexual Assault Cases: autossomal or Y chromosome short tandem repeats?** Croation Medical Journal, v. 44, n. 3, p. 289-92. 2003.

CHATTERJI S., PACHTER L. **Reference based annotation with GeneMapper**. Genome Biology, v. 7, n. 4, p. 29. 2006.

CHAUDHARY R., SINGH A. K., SINGH S. **Identification of Sexual Offender, Vasectomized Male Involved in Rape Cases by Using STR's in Y-chromosome**. Journal Indo-Pacific Academy of Forensic Odontology, v. 1, n. 2, p. 30-2. 2010.

CORTE-REAL F. **Forensic DNA databases**. Forensic Science International, v. 146, p. 143-4. 2004.

COLLINS P. J., HENNESSY L. K., LEIBELT C. S., ROBY R. K., REEDER D. J., FOXALL P. A. **Developmental validation of a single-tube amplification of the 13 CODIS STR loci, D2S1338, D19S433, and amelogenin: the AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit**. Journal of Forensic Science, v. 49, n. 6, p. 1265-77. 2004.

COULOURIS D. **Violência Gênero e Impunidade: A construção da verdade nos casos de estupro**. Dissertação [Stricto Sensu] Programa de Pós-Graduação em Ciências Sociais da Faculdade de Filosofias e Ciências da Universidade Estadual Paulista, Marília-SP. 2004.

CP. **Código Penal**. Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de Dezembro de 1940. Texto Compilado. [acessado em 23 jun 2012]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto-Lei/Del2848.htm

CPP. **Código de Processo Penal**. Decreto Lei 3681, de 3 de Outubro de 1941. Art. 158.

DE PAULA K. A. **Análise Molecular Com Y-Strs Em Amostras Biológicas Sem Espermatozoides Coletadas de Vítimas de Estupro**. Brasília. Dissertação [Stricto Sensu] Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília. 2011.

DREZETT J., CABALLERO M., JULIANO Y., PRIETO E. T., MARQUES J. A., FERNANDES C. E. **Estudo de Mecanismos e Fatores Relacionados com o Abuso Sexual em Crianças e Adolescentes do Sexo Feminino**. *Jornal de Pediatria*, v. 77, n. 5, p. 413-9. 2001.

DREZETT J., JUNQUEIRA L., ANTONIO I. P., CAMPOS F. S., LEAL M. C. P., IANNETTA R. **Contribuição ao Estudo do Abuso Sexual Contra a Adolescente: uma perspectiva de saúde sexual e reprodutiva e de violação de direitos humanos**. *Adolescência e Saúde*, v. 1, n. 4, p. 31-9. 2004.

DREZETT J., JUNQUEIRA L., TARDELLI R., ANTONIO P. I., MACEDO H. J., VERTAMATTI M. A. F., PIMENTEL R. M., ABREU L. C. **Influência do exame médico-legal na responsabilização do autor da violência sexual contra adolescentes**. *Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano*, v. 21, n. 2, p. 189-97. 2011.

DUARTE F., PEREZ A., PENA S., DE BARROS M., ROSSI E. **A Avaliação do DNA Como Prova Forense**. FUNPEC-Ribeirão Preto, p. 283. 2001.

ESPINDULA A. **Local de Crime. Isolamento e Preservação, Exames Periciais e Investigação Criminal**. Colaboradores Antonio Mestre Junior et al. Brasília: Alberi Espindula, 16p. 2002.

FAÚNDES A., ROSAS C. F., BEDONE A. J., OROZCO L. T. **Violência sexual: procedimentos indicados e seus resultados no atendimento de urgência de mulheres vítimas de estupro**. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 28, n. 2, p. 126-35. 2006.

FBI. Federal Bureau of Investigation. **CODIS Brochure**. 2010. [acessado em 07 de maio de 2012]. Disponível em: http://www.fbi.gov/about-us/lab/codis/codis_brochure

FBI. Federal Bureau of Investigation. **CODIS-NDIS Statistics**. [acessado em 05 de agosto de 2012]. Disponível em: <http://www.fbi.gov/about-us/lab/codis/ndis-statistics>

FOLHA DE SÃO PAULO. Jornal on line. **Veja quem é o maniaco do parque**. 2000. [acessado em 22 de novembro de 2012]. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u16913.shtml>

GARVIN A. M., BOTTINELLI M., GOLA M., CONTI A., SOLDATI G. **DNA Preparation from Sexual Cases by Selective Degradation of Contaminating DNA from the Victim**. Journal Forensic Science, v. 54, n.6, p 1297-1303. 2009.

GILL P., JEFFREYS A. J., WERETT D. J. **Forensic application of DNA “fingerprints”**. Nature, v. 318, n. 6046, p. 577-9. 1985.

GREEN R. L., ROINESTAD I. C., BOLAND C., HENNESSY L. K. **Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples**. Journal Forensic Sciences, v. 50, n. 4, p. 809-25. 2005.

GUSMÃO L., BUTLER J. M., CARRACEDO A., GILL P., KAYSER M., MAYR W. R., MORLING N., PRINZ M., ROEWER L., TYLER-SMITH C., SCHNEIDER P. M. **DNA commission of the international society of forensic genetics (ISGF): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis**. Forensic Science International, v.157, p. 187-97. 2006.

_____. **Integrated Use of the Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit and the AmpFISTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit in Sexual Assault Cases**. Applied Biosystems. [acessado em 10 nov 2011]. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/d1jg4lmm.pdf>

HANSON E. K., BALLANTYNE J. **An Ultra-High Discrimination Y Chromosome Short Tandem Repeat Multiplex DNA Typing System**. PLoS ONE, v. 2, n. 8, e 688. doi:10.1371/journal.pone.0000688. 2007.

HIRSCHFELD G. C. R., ALONSO D. C., PARDI P. C., STRINGER C. G., FERNANDES A. P., SANTOS O. B. D. **Análise dos Marcadores do Cromossomo Y em Evidências Criminais de Contribuintes Vasectomizados**. Revista de Medicina Legal, Direito Médico e da Saúde, vol. 1, n. 3. 2005.

HONDA K., ROEWER L., KNIJFF P. **Male DNA Typing from 25-Year-Old Vaginal Swabs Using Y Chromosomal STR Polymorphisms in a Retrial Request Case.** *Journal Forensic Sciences*, v. 44, n. 4, p. 868–72. 2009.

HORNSTEIN J. **AmpFISTR® Yfiler® kit drives the success of Y chromosome analysis in forensic genetics.** Life Technologies. 2012. [acessado em 05 de julho de 2012]. Disponível em: <http://lifetechnologies.com/us/en/home/communities-social/blog/blogs/Y-Testing>

JOBLING M. A., GILL P. **Encoded Evidence: DNA in Forensic Analysis.** *Nature Reviews Genetics*, v. 5, p. 739-52. 2004.

JOBLING M. A., KING T. E. **The distribution of Y-chromosomal haplotypes: forensic implications.** *International Congress Series*, v. 1261, p. 10-2. 2004.

JOHNSON C. L., GILES R. C., WARREN J. H., FLOYD J. I., STAUB R. W. **Analysis of non-suspect samples lacking visually identifiable sperm using a Y-STR 10-plex.** *Journal Forensic Science*, v. 50, n. 5. 2005.

JOHNSON P., WILLIAMS R., MARTIN P. **Genetics and Forensics: Making the National DNA Database.** *UKPMC Funders Group*, v. 16, n. 2, p. 22–37. 2003.

KHALDI N., MIRAS A., BOTTI K., BENALI L., GROMB S. **Evaluation of Three Rapid Detection Methods for the Forensic Identification of Seminal Fluid in Rape Cases.** [Nota Técnica]. *Journal Forensic Science*, v. 49, n. 4. 2004.

KOCH A., ANDRADE F. M. **A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão.** *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 40, n. 1, p. 17-23. 2008.

LAGOA A. M. **Análise genética de impressões digitais – amostras *Low Copy Number*.** Cidade do Porto – Portugal. Dissertação [Stricto Sensu] Ciências Forenses. Universidade do Porto. 2007.

LAPEÑA S., GAZTAMBIDE A., HUARTE I. **Agresión sexual.** *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, v. 32, Suplemento 1, p. 59-63. 2009.

LEWIN B. **Genes IX.** Porto Alegre. Ed. Artmed. 9ª ed. Cap. 6. 2009.

LIMA, H. B. **DNA x Criminalidade**. Revista Perícia Federal, n. 26, p. 8-11. 2008.

MALLMITH D. M. **Vestígio material, corpo de delito, evidência e indício**. [s.d.] [acessado em 03 de abril de 2012]. Disponível em: <http://www.acrigs.com.br/Artigos/Mallmith-Vestígio%20Material.pdf>

MARANO L. A., SIMÕES A. L., OLIVEIRA S. F., MENDES-JUNIOR C. T. **Polimorfismo genético e identificação humana: o DNA como prova forense**. Genética na Escola, v. 05, n. 01, p. 53-6. 2010. [acessado em 01 de agosto de 2012]. Disponível em: <http://www.sbg.org.br>

MATTEI F. S., ALBUQUERQUE T. C. K. **Tecnologia Plexor para PCR em Tempo Real e sua Aplicação na Genética Forense**. III Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação-PUCRS. 2008. [acessado em 20 de março de 2012]. Disponível em: <http://www.pucrs.br/edipucrs/online/III Mostra/BiologiaCelulareMolecular/61923%20-%20FABIOLA%20SALENE%20MATTEI.pdf>

_____. **Método da Curva Padrão para Quantificação Relativa**. Applied Biosystems. [acessado em 10 de novembro de 2011]. Disponível em: <http://www.appliedbiosystems.com.br/site/material/d1jg4lmm.pdf>

MULERO J. J., CHANG C. W., CALANDRO L. M., GREEN R. L., LI Y., JOHNSON C. L., HENNESSY L. K. **Development and validation of the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system**. Journal of Forensic Science, v. 51, n. 1, p. 64-75. 2006.

MUNIZ S. S., SILVA P. Q. **A utilização de Marcadores Moleculares de DNA Aplicados nas Investigações Forenses**. [acessado em 20 de maio de 2012]. Disponível em: <http://www.cpgls.ucg.br/ArquivosUpload/1/File/.../SAUDE/80.pdf>

NETO E. D. **O Projeto Genoma Humano**. In: MIR, Luís (Org.). Genômica. São Paulo: Atheneu, 1ª ed., p. 41-57. 2004.

NPIA. National Policing Improvement Agency. **National DNA Database Strategy Board Minutes**. Meeting December. 2011. [acessado em 07 de junho de 2012]. Disponível em: http://www.npia.police.uk/en/docs/Strat_Board_Minutes_final_Dec_20111.pdf

NPIA. National Policing Improvement Agency. **National DNA Database**. [acessado em 07 de junho de 2012]. Disponível em: <http://www.npia.police.uk/en/8934.htm>

NUSSBAUM R. L., MCINNES R. R., WILLARD H. F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. Tradução Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed. 2002.

O'DONNELL P., MONTPETIT S., VARLANO J., SCHADE L.L., CALANDRO L. **An integrated sexual assault solution**. NCJ 224226. Journal Forensic Magazine. Vol. 5, April-May 2008. [acessado em 03 de março de 2012]. Disponível em: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/cms_053466.pdf

OLIVEIRA E. M., BARBOSA R. M., MOURA A. A. V. M., KOSSEL K. V., MORELI K., BOTELHO L. F. F., STOIANOV. M. **Atendimento às mulheres vítimas de violência sexual: um estudo qualitativo**. Revista de Saúde Pública, v. 39, n. 3, p. 376-82. 2005.

OMS. Organização Mundial De Saúde. **Relatório Mundial Sobre Violência e Saúde**, cap. 06. 2006. [acessado em 03 de março de 2012]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2002/9241545615_chap6_eng.pdf

PACHECO A. C. **Emprego de mini STRs “non CODIS” em Amostras Biológicas de DNA Forense**. São Paulo. Dissertação [Stricto Sensu] Biotecnologia. USP/ Instituto Butantã/IPT. 2010.

PALHA T., RUBEIRO-RODRIGUES E., RIBEIRO-DOS-SANTOS A., SANTOS S. **Fourteen short tandem repeat loci Y chromosome haplotypes: Genetic analysis in populations from northern Brazil**. Forensic Science International: Genetics n. 6, p. 413–8. 2012.

PATRINOS G. P., ANSORGE W. **Molecular Diagnostics**. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. Elsevier Ltda., 2ª ed., cap. 26. 2010.

PINHEIRO M. F. T. **A perícia em genética e biologia forense – criminalística biológica**. CSI Criminal. Edições Universidade Fernando Pessoa-Porto, p. 11-40. 2008.

PORTAL DA SAÚDE. **O que é violência contra a mulher?** [acessado em 03 de março de 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?ldtxt=33903

PROMEGA. **Plexor® HY System for the Bio-Rad iQ™5 Real-Time PCR Detection System**. Manual Técnico. Revisão 12/10. ([s. d.]).

RIBEIRO M. A., FERRIANI M. G. C., REIS J. N. **Violência sexual contra crianças e adolescentes: características relativas à vitimização nas relações familiares.** Caderno de Saúde Pública, v. 20, n. 2, p. 456-64. 2004.

RODRIGUES A. G. A. **Análise de Polimorfismo de DNA em Amostras Degradadas.** Dissertação [Stricto Sensu] Biologia Molecular e Celular. Universidade de Aveiro. 2008.

ROEWER L. **Y chromosome STR typing in crime casework.** Forensic Science Medicine and Pathology, v. 5, n. 2, p. 77-84. 2009.

SAWAYA, M. C. T.; ROLIM, M. R. S. **Antígeno específico da próstata em fluidos biológicos: aplicação forense.** Visão Acadêmica, v. 5, n. 2, p. 109-16. 2004. [acessado em 10 de novembro de 2011]. Disponível em: <http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/academica/article/view/555>

SCHMICKLER C. M., BORBA F. E. **Diagnóstico inconclusivo para abuso sexual de meninas no âmbito familiar.** Revista. Fazendo Gênero, n. 8. 2008. [acessado em 17 fev 2012]. Disponível em: www.fazendogenero.ufsc.br/8/sts/ST41/Schmickler-Borba_41.pdf

SENASP. Secretaria Nacional de Segurança Pública. **Anuário Brasileiro de Segurança Pública**, ano 5. 2011. [acessado em 17 de fevereiro de 2012]. Disponível em: <http://www2.forumseguranca.org.br/content/anu%C3%A1rio-brasileiro-de-seguran%C3%A7a-p%C3%BAblica-2011>

SIBILLE I., Duverneuil C., Lorin de la Grandmaison G., Guerrouache K., Teissière F., Durigon M., de Mazancourt P. **Y-STR DNA amplication as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa.** Forensic Science International, v. 125, n.2-3, p.212-6. 2002.

SOUZA C. M., ADESSE L. Organizadores. **Violência Sexual no Brasil: perspectivas e desafios.** 2005 [acessado em 17 de fevereiro de 2012]. Disponível em: http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/br000029.pdf

STRACHAN T., READ A. P. **Genética Molecular Humana.** Tradução Henrique Buselmeyer Ferreira et al. Porto Alegre: Artemed, 2ª ed. 2002.

SWGDM - Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. **Y-chromosome Short Tandem Repeat (Y-STR) Interpretation Guidelines.** v. 11, n. 1. 2009.

[acessado em 17 de março de 2012]. Disponível em: <http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/jan2009/standards>

TEIXEIRA P. A. S., PINTO A. S., MORAES O. C. R. Organizadores. **Dossiê Mulher**. Secretaria de Segurança Pública, Rio de Janeiro. 2012.

TEREBA A., FLANAGAN L., MANDREKAR P., OLSON R. **A new, rapid method to separate sperm and epithelial cells**. Profiles in DNA. 2004. [acessado em 10 de março de 2012]. Disponível em: <http://www.promega.com>

TORRES Y., ALER M., PLATA A., DOMINGUEZ A., SANZ P., GISBERT M. **Factores que afectan al análisis biológico de lãs muestras de agresiones sexuales**. Cuadernos de Medicina Forense, v. 13, n. 47. 2007.

_____. **Utilizing the Quantifiler Duo DNA quantification kit as a guide to efficient forensic evidence**. Applied Biosystems. 2008. [acessado em 10 de novembro de 2011]. Disponível em: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_marketing/documents/generaldocuments/cms_053411.pdf

VIANNA E. V. A. **Crimes Sexuais Contra Vulnerável: uma breve abordagem no contexto constitucional**. 2011. [acessado em 03 de março de 2012]. Disponível em: <http://www2.tjce.jus.br:8080/dike/wp-content/uploads/2010/11/Erica-Vasconcelos-de-Aquiar.pdf>

VIEIRA J. R. S., SILVA A. A., RODRIGUES B. T. F., ÁLVAREZ C. S., ALVES E. S. R., VIEIRA G. M. M. **Identificação de atividade ácida prostática em manchas contendo materiais biológicos e alimentos simulados para a análise**. NewsLab, ed. 85, p. 140. 2007.

VIEIRA J. A. S., BIKKERBECK A. E. C., IWAMUR E. S. M., ZAMPIERE R. A., GATTÁS G. J. F., MUNOZ D. R., HALLAK J., MENDONÇA B. B., LUCON A. M. **Y-STRs in Forensic Medicine: DNA Analysis in Semen Samples of Azzospermic Individuals**. Journal of Forensic Science, v. 52, n. 3. 2007.

WANBAUGH J. **The Bleeding**. New York: Perigord. Press/William Morrow & Co, p. 288. 1989.

WOLF A., CALIEBE A., JUNGE O., KRAWCZAK M. **Forensic interpretation of Y-chromosomal DNA mixtures**. Forensic Science International, v. 152, n. 2-3, p. 209-13. 2005.

YHRD. **Y Chromosome Haplotype Reference Database**. YHRD.ORG3.0 Homepage. [acessado em 05 de agosto de 2012]. Disponível em: <http://www.yhrd.org/Search/Haplotypes;;s>

YOSHIDA K., SEKIGUCHI K., MIZUNO N., KASAI K., SAKAI I., SATO H., SETA S. **The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen**. Forensic Science International, v. 72, n. 1, p. 25-33. 1995.