

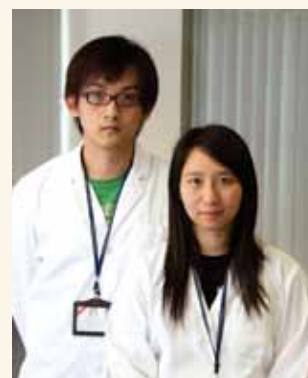
DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS DE ANÁLISE DO ADN NA MEDICINA FORENSE EM MACAU

Secção de Bioquímica do Departamento de Ciências Forenses

Técnica de 1ª Classe
Técnico de 2ª Classe

Wu Kit Ian
Ng Chok Kei

Resumo: As técnicas de análise da medicina forense relativas ao ADN (*DNA Profiling*) representam um dos ramos técnico-científicos mais importantes na produção de prova em tribunal. Esta técnica baseia-se nas teorias e nos conhecimentos da clínica médico-forense, a fim de proceder à análise de amostras orgânicas humanas, por forma a demonstrar a identificação dos indivíduos ou realizar testes de paternidade. Em Abril de 2003, foi concluído o Projecto Genoma Humano, relatando que nos 3,165 milhões de bases nitrogenadas do sequenciamento do genoma existem grandes quantidades de marcadores polimórficos de ADN que são altamente variáveis entre indivíduos. A partir daí, houve grandes avanços no desenvolvimento das investigações e da aplicação dessas técnicas. Portanto, este estudo apresenta principalmente o desenvolvimento das técnicas de análise do ADN na medicina forense em Macau.



Palavras-chave: Técnicas de Análise do ADN na Medicina Forense, ADN, STR

Nos anos 20 do século XIX, com o estudo de Orfila sobre a variação dos vestígios de sangue, do pó, do corante, entre outros, e posteriormente, nos finais do século XIX, com o surgimento das técnicas de análise de identificação dos vestígios de sangue, do sémen e do sistema sanguíneo ABO, a clínica médico-forense entrou, a partir daí, numa era científica.

Em 1944, Oswald Avery reconheceu que as características hereditárias contidas nas células de ADN são transmitidas de geração para geração. Em 1985, o cientista inglês Jeffreys descobriu o Minisatélite (*Variable Numbers of Tandem Repeats, VNTR*), e nesse mesmo ano, Mullis descobriu a Reacção de Polimerização em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction, PCR*). A partir

daí, os cientistas reconheceram que o marcador genético de ADN possui uma vantagem, isto é, a recolha das amostras necessárias são reduzidas e o tempo necessário para análise é mais curto, originando esforço e dedicação por parte dos cientistas em estudar a sua aplicação nas análises da medicina forense. Só depois de 1993 é que o Microsatélite (*Short Tandem Repeat, STR*) é usado popularmente a nível internacional, formando assim, a estrutura principal da técnica de análise do ADN na medicina forense (*DNA Profiling*).

I. NATUREZA BIOLÓGICA DO ADN

ADN, ácido desoxirribonucleico, é uma substância química que contém as informações genéticas necessárias para replicar as células e

sintetizar as enzimas. A sua unidade básica é composta pelo nucleótido, que é constituído pela base nitrogenada, açúcar e fosfato. O tipo do nucleótido seria decidido pela base nitrogenada dentro de cada unidade nucleótido, o açúcar e o fosfato compõem o quadro da molécula de ADN (figura 1).

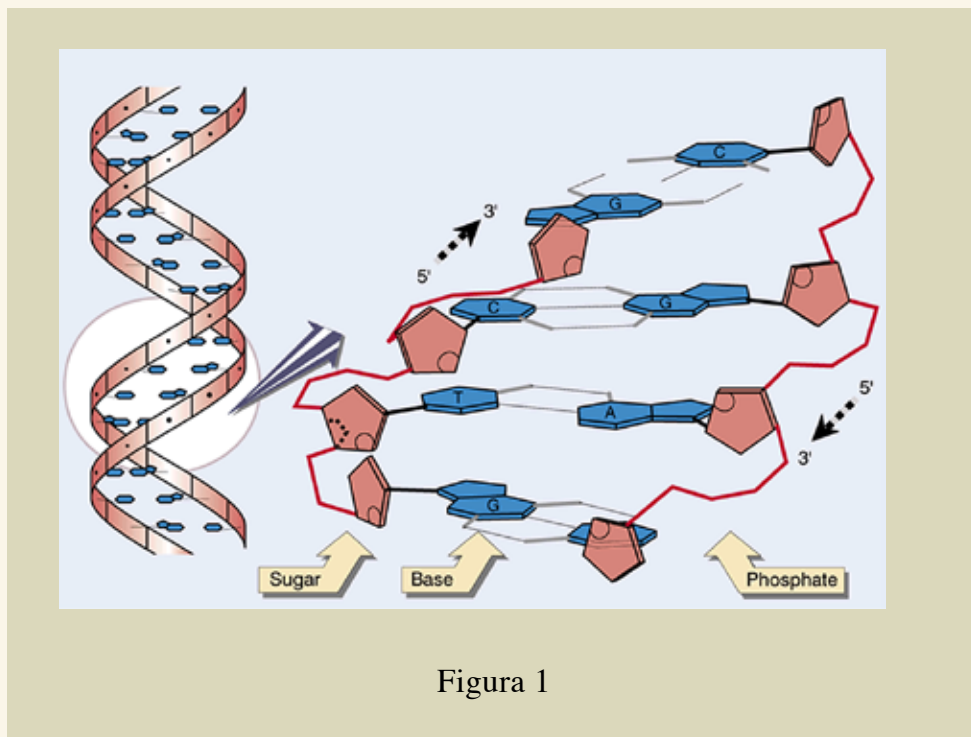


Figura 1

A molécula de ADN contém os 4 principais nucleótidos: Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) e Guanina (G). Esses 4 tipos de nucleótidos agrupam-se com diferentes sequências, determinando assim as características biológicas dos seres humanos e de todos os seres vivos. O genoma humano é composto por 23 pares de cromossomas (22 pares de cromossomas autossómicos e 1 par de cromossomas sexuais) e ADN mitocondrial.

O ADN contido nos cromossomas divide-se em regiões codificantes e regiões não codificantes. As regiões codificantes são também conhecidas por genes, contendo as proteínas necessárias às informações genéticas, e que ocupam 5% do genoma humano. As regiões codificantes possuem

grande parte das marcações de identificação dos indivíduos, ocupando 95% do genoma humano.

II. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO ADN

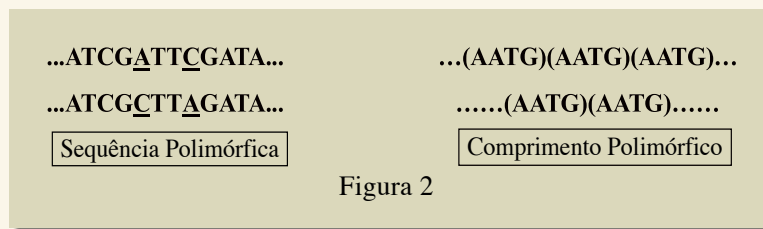
A identificação de indivíduos na clínica médico-forense é comprovada com a ajuda dos marcadores

genéticos através de análise e comparação. Os marcadores genéticos são unidades hereditárias genéticas, ou seja, aquilo que pode ser analisado, que é decidido pela hereditariedade e que consegue transmitir-se nas características morfológicas, fisiológicas ou biológicas de geração para geração. Durante o processo de desenvolvimento da clínica médico-forense usaram-se diferentes marcadores genéticos em diferentes períodos,

um dos exemplos é o sangue ABO. No corpo humano existem vários marcadores genéticos, por isso, seria impossível utilizá-los todos de uma vez durante o procedimento de identificação de um indivíduo, mas usa-se uma determinada quantidade desses marcadores. Com o desenvolvimento da técnica científica, a melhor compreensão e o enriquecimento do conhecimento dos marcadores genéticos, os testes efectuados passaram das amostras de sangue ao ADN.

As técnicas de análise do ADN na medicina forense estudam e analisam principalmente o polimorfismo do ADN contido no corpo dos seres vivos. De um modo geral, à posição de um gene ou regiões não codificantes num cromossoma de ADN chamamos locus, e a uma sequência de ADN

(gene) situada no mesmo locus e que corresponde a diferentes versões do mesmo gene chamamos alelo. O polimorfismo do ADN é um marcador genético com locus de vários alelos. Analisar a diferença entre o alelo num locus é uma base biológica e uma forma de se identificar um indivíduo. A natureza polimórfica divide-se em sequência polimórfica e comprimento polimórfico (figura 2).



Segundo as regras ditadas por Gregor Johann Mendel, a estrutura específica de ADN da geração filial é transmitida através dos pais, isto é, cromossomas homólogos que têm localização idêntica nos dois alelos, um conjunto herdado da mãe e outro do pai. Os genes desses dois alelos na mesma posição podem ser iguais ou diferentes. Estas regras de herança, estabelecidas por Gregor Johann Mendel, evidenciam os polimorfismos do ADN com características diferentes entre os indivíduos, são bases teóricas para a identificação de indivíduos e do teste de paternidade.

III. MICROSSÁTELITE OU *SHORT TANDEM REPEAT*

O STR (Microsatélite ou *Short Tandem Repeat*) é hoje um dos mais utilizados marcadores do ADN, são sequências nucleotídicas repetitivas de 2-6bp de dimensão, formando fragmentos de ADN. O STR está distribuído extensivamente no genoma humano, em cada 6-10kb existem um, e foram descobertos até hoje mais de 8.000 loci de STR. Nas cópias repetitivas de STR formam-se polimorfismos genéticos entre indivíduos, aos quais corresponde o estudo do autossômico dominante de Gregor Johann Mendel. Além disso, o fragmento de STR pode ser amplificado através

da técnica de PCR, em que o seu fragmento amplificado é inferior a 400bp. Desde modo, a utilização da técnica de locus do STR tem melhor efeito quando a quantidade de amostras é reduzida ou degradada, por isso é uma das técnicas mais aplicadas na identificação de indivíduos e em testes de paternidade, ao nível internacional.

IV. DESENVOLVIMENTO DAS TÉCNICAS DE ANÁLISE DO ADN NA MEDICINA FORENSE EM MACAU

Em Macau, cabe ao Departamento de Ciências Forenses da Polícia Judiciária ao trabalho de análise de ADN. Antigamente eram usadas amostras de sangue e polymerose para a exclusão de indivíduos. Em 1998, começaram a utilizar-se a *Polymerase Chain Reaction* e *Predicular Gel Electrophoresis Technique*, em conjunto com o uso do *silver staining* para a identificação de 3 loci. Em 2000, para aumentar a credibilidade do resultado das análises, foi introduzida uma tecnologia nova para a identificação de 9 loci. Entre 2002 e 2004, a nossa Polícia começou a estudar a possibilidade de utilizar aparelhos totalmente automáticos para a substituição das operações manuais e a partir de então conseguiu-se a localização de 16 loci, tendo-se elevado bastante a exactidão tanto no teste de identificação de indivíduos como no de determinação de paternidade.

Actualmente, o trabalho quotidiano do Departamento de Ciências Forenses da Polícia Judiciária reside no estudo do polimorfismo do ADN para proceder ao teste de identificação de indivíduos e de determinação de paternidade. As substâncias biológicas geralmente encontradas são esperma, saliva, líquido vaginal ou outras secreções humanas, e ainda osso, cabelo ou outros tecidos. Mediante a análise destas substâncias acima geram-se provas científicas importantes para a investigação e para utilizar no julgamento, bem como para a apreciação de casos do foro civil.

O Departamento de Ciências Forenses

da Polícia Judiciária utiliza diversas técnicas internacionalmente conhecidas, para a análise, vamos aqui apresentar quatro:

Relativamente à recolha e purificação do ADN, era geralmente usado um método conhecido por *Chelex*, através do qual, o *supernatant liquid* podia efectuar directamente a *Polymerase Chain Reaction* sobre as substâncias biológicas comuns, tais como sangue, vestígios sanguíneos e esperma. No entanto, a maior parte das substâncias biológicas recolhidas no local do crime possuíam uma certa quantidade de matéria impura e inibidores, os quais afectaram, conseqüentemente, a reacção e a análise do polimorfismo do ADN. Por isso, para evitar estas dificuldades, hoje em dia, usa-se um método designado por *Solid-Phase Extraction* para a recolha e a purificação das substâncias submetidas ao exame de ADN (dois produtos mais conhecidos são *QIAampADN[®] Mini Kit* e *DNA IQTM System*). O *Solid-Phase Extraction* é um método de grande sucesso para a recolha de ADN, consegue separar com eficácia diversos materiais impuros e inibidores que existem nas substâncias biológicas. Por isso, actualmente, o nosso laboratório utiliza o *Chelex* e o *Solid-Phase Extraction* para a recolha e purificação do ADN de acordo com o tipo e a natureza das substâncias biológicas encontradas.

O sucesso do *Polymerase Chain Reaction* depende da quantidade de ADN e a existência ou não de inibidores nas substâncias submetidas a análise. Anteriormente era usado um método designado por *Human Peculiar Probe Hybridization* (os dois produtos mais usados são *QuantiBlot Kit Method* e *Alu Quant Human DNA Quantity System*). Para além da complexidade e morosidade desse método, o resultado do teste não revelava a existência de inibidores nas substâncias submetidas a exame. Actualmente, para resolver este problema, procede-se ao teste de quantidade de ADN com o produto *Plexor[®]HY System*, em conjunto com a *Polymerase Chain Reaction* a fim

de confirmar a quantidade de ADN nas substâncias submetidas a exame. Através desta técnica, além da quantidade de ADN, podemos saber ao mesmo tempo se existem ou não inibidores nas substâncias em exame, havendo uma elevada taxa de sucesso do teste *Polymerase Chain Reaction*.

Nos casos de análise do polimorfismo do ADN, usa-se principalmente as *Fluorescent Sinal Multiplex STRs*, em conjunto com um sistema automático para a análise genética, a fim de analisar e ler o *human autosomala STR loci* e o cromossoma *Y-STR loci*. Geralmente, com o produto *PowerPlex[®] 16 System Amplification Kit*, podemos identificar 16 tipos de STR loci. Por outro lado, encontra-se disponível no mercado o produto *AmpFtSTR[®] Yfiler PCR Amplification Kit*, o qual se pode utilizar para analisar o *Y-STR* do sexo masculino contido no ADN. Nos últimos anos, com a introdução do *AmpFtSTR[®] SEfiler PCR Amplification Kit*, conseguimos identificar 19 loci, tendo aumentado bastante a taxa de credibilidade no teste de paternidade.

As substâncias biológicas podem ser encontradas no local do crime, no corpo do suspeito ou da vítima ou nos instrumentos usados nas ofensas corporais, etc, por isso o resultado da análise do ADN tem um papel muito importante no âmbito das provas científicas a apresentar em tribunal. Hoje em dia, o teste do ADN, adoptado a nível internacional, concentra-se na análise dos loci STR. No entanto, devido a diversos factores, não conseguimos obter facilmente um mapa dos tipos STR relativamente completo com substâncias biológicas recolhidas no local de crime, mediante a adopção de um método de análise normal, pelo que, a *STR Typing Specific Amplification*, em conjunto com uma análise de alta sensibilidade, é a única forma de obter um mapa de boa qualidade. Actualmente estão em curso investigações com vista a aprofundar o trabalho nesta área que se espera venham a aumentar os níveis de eficácia nas análises de ADN.

V. CONCLUSÃO

A partir da década de 80 do Século XX, assistiu-se a uma reforma tecnológica que introduziu uma verdadeira revolução nas técnicas usadas na análise do ADN, houve portanto uma melhoria nas capacidades das polícias no combate à criminalidade. Contudo, é necessário utilizar técnicas científicas para descobrir, recolher e analisar as provas encontradas, cuja análise esclarece a existência de uma relação entre o

resultado da peritagem e os factos provenientes do crime em causa, por isso temos de cumprir com rigor as regras lógicas de operação e as teorias científicas para a interpretação das conclusões obtidas. Como a análise do ADN está ligada a várias disciplinas, sobretudo à biologia, à química biológica, à biologia molecular, à metodologia, à genética e à estatística, este tipo de análise torna-se uma das técnicas mais exacta para identificar os indivíduos suspeitos da prática de um crime desde o início do uso do exame dactilópico.

Bibliografia:

1. Jia Jingtao, *Evolução das Ciências Forenses e do Direito no Mundo*, Pequim, Editora Ciências, 2000.
2. John M. Butler, *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, Second Edition*. Elsevier(USA), 2005.
3. Hou Yiping, *Provas Forenses (2ª edição)*, Pequim, Editora Saúde de Povo, 2005.
4. Zheng Xiufen, *Análise de ADN Forense (1ª edição)*, Pequim, Editora Universidade de Segurança Pública do Povo Chinês, 2002.
5. Mandrekar, P.V., Krenke, B.E. and Tereba, A., *DNA IQ™: The intelligent way to purify DNA. Profiles in DNA*, 2001, 4(3): 16.
6. Krenke, B. et al., *Validation of a 16-locus Fluorescent Multiplex System. J. Forensic Sci.* 2002, 47: 773-785.
7. Budowle, B. et al., *STR Primer Concordance Study. Forensic Sci. Int.*, 2001, 124: 47-54.
8. Sprecher, C. et al., *The PowerPlex™ 16 System. Profiles in DNA*, 2000, 4(1): 3.