

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO

Tese de mestrado  
Mestrado em Medicina Legal

**Importância Médico-Legal dos marcadores usados nos testes  
de paternidade**

Hugo Rodrigues Ferreira Leite

Orientador

Professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa

Porto 2013



Hugo Rodrigues Ferreira Leite

## **Importância Médico-Legal dos marcadores usados nos testes de paternidade**

Dissertação de Candidatura ao grau de mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa.  
Categoria – Professora associada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Afiliação – Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.



## Resumo

A questão da paternidade, tão longa como a história da Humanidade, esteve durante muitos séculos sujeita à Lei do compromisso Sagrado, onde aos homens pouco mais restava que acreditar na fidelidade das respetivas esposas.

Tal situação alterou-se dramaticamente no fim do século XIX com a perceção de como ocorria a heretriedade, descrita pelas Leis de *Mendel*. Logo surgiram sistemas pouco fiáveis de atribuição de paternidade, que foram se aprimorando até à descoberta do ADN *fingerprint*.

A descoberta do ADN *fingerprint* permitiu identificar pessoas com base no seu património genético, e atribuir a paternidade biológica ao verificar a compatibilidade da transmissão dos alelos, segundo as Leis da heretriedade de *Mendel*, entre filho, pai e mãe.

Desde a sua descoberta, a introdução de novos *loci* para fins identificativos parece não ter fim, assim como, a quantidade de marcadores que cada teste usa para fins de identificação e atribuição de paternidade. De tal forma, que hoje estão disponíveis no mercado testes com poder de discriminação superior ao número de Humanos no planeta, atribuindo-lhes uma certeza teórica de praticamente 100%.

Este trabalho assenta numa reflexão sobre os marcadores e as amostras biológicas que os diferentes laboratórios usam na determinação da paternidade e nos marcadores constantes na Portaria 270/09, de 17 de março.

## **Abstract**

*The question of paternity, as long as the history of Humankind, was for centuries subject to the law's of Sacred commitment, where the men have no other option than believe in the fidelity of the respective wives.*

*This situation changed dramatically in the late XIX century, with the perception of how the Inheritance occurred, described by Mendel's laws. Soon there, it was developed the first scientific method to discovery the biological paternity, but they were unreliable. But it was given the first step and they were improving the tests until the discovery of DNA fingerprint.*

*The discovery of DNA fingerprint allowed identify people based on their genetic code, testing the biological paternity, how checking the compatibility of the transmission of alleles, under the Mendel Laws of Inheritance between son, father and mother.*

*Since its discovery, the introduction of new loci for identification purposes seems endless, as well as the number of markers that each test uses for identification and paternity purposes. Nowadays are available tests with higher power of discrimination than the number of humans living on the planet, giving them a theoretical certainly of virtually 100%.*

*This work is based on a reflection about the markers and biological samples that different laboratories use in paternity determination and in the alleles contained in ordinance 270/09, of March, 17<sup>th</sup>.*

## **Agradecimentos:**

Ao Professor Doutor José Eduardo Pinto da Costa por ter despertado o meu interesse pelo mundo das ciências médico-legais.

À diretora do Mestrado em Medicina Legal e minha orientadora de mestrado a Professora Doutora Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa pela oportunidade em frequentar o mestrado em Medicina Legal e por todo o apoio demonstrado na realização deste trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Cíntia Alves, Dr. Rafael Teixeira, Dr.<sup>a</sup> Teresa Ribeiro, Dr.<sup>a</sup> Maria João, Dr.<sup>a</sup> Lurdes Ribeiro, pela colaboração, ajuda e acesso a dados fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

À Dr.<sup>a</sup> Paula Rendeiro, Dr.<sup>a</sup> Purificação Tavares e ao laboratório *CGC Genetics*<sup>®</sup>, pela colaboração.

Ao Dr. Rui Silva do laboratório *Labmed*<sup>®</sup> pela colaboração e disponibilidade em ajudar.

E a todos os meus colegas de curso, amigos e familiares.



## Índice de Abreviaturas:

- Â** – média do poder de exclusão do *locus*;
- AC** – Antes de Cristo;
- ADN** – Ácido Desoxirribonucleico;
- AI** – Índice Avuncular (do Inglês *avuncular index*);
- APC** – Células Apresentadoras de Antígeno;
- ARN** – Ácido Ribonucleico;
- CAI** – Índice Cumulativo Avuncular (do Inglês *cumulative avuncular index*);
- CCP** – Código Civil Português;
- CMH** – Complexo Major de Histocompatibilidade;
- CPI** – Índice Cumulativo de Paternidade (do Inglês *cumulative paternity index*);
- CPP** – Código de Processo Civil;
- DGPJ** – Direção-Geral da Política de Justiça;
- EUA** – Estados Unidos da América;
- GEP - ISFG** – *International Society for Forensic Genetics* - Grupo de trabalho Luso-Espanhol;
- HLA** – *Human Leukocyte Antigen*;
- IGFEJ, IP** – Instituto de Gestão Financeira e Equipamentos da Justiça, Instituto Público;
- INMLCF, IP** – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Instituto Público;
- MLS** – *Medico-Legal Society of New York*;
- mRNA** – Ácido Ribonucleico mensageiro;
- NIST** – *National Institute of Standards and Technology*;
- PCR** – *Polymerase Chain Reaction*;
- PD** – Poder de Discriminação;
- PE** – Poder de Exclusão;
- PI** – Índice de Paternidade (do Inglês, *paternity index*);
- RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphism*;
- RMNE** – Probabilidade de um Homem aleatório não ser excluído (do Inglês, *Random Man Not Excluded*);
- STR** – *Short Tandem Repeats*;
- SSR** – *Simple Sequence Repeats*;
- tRNA** – Ácido Ribonucleico de transferência;
- VNTR** – *Variable Number of Tandem Repeats*;
- W** – Probabilidade de paternidade;
- μ** - Taxa de mutação do *locus*.



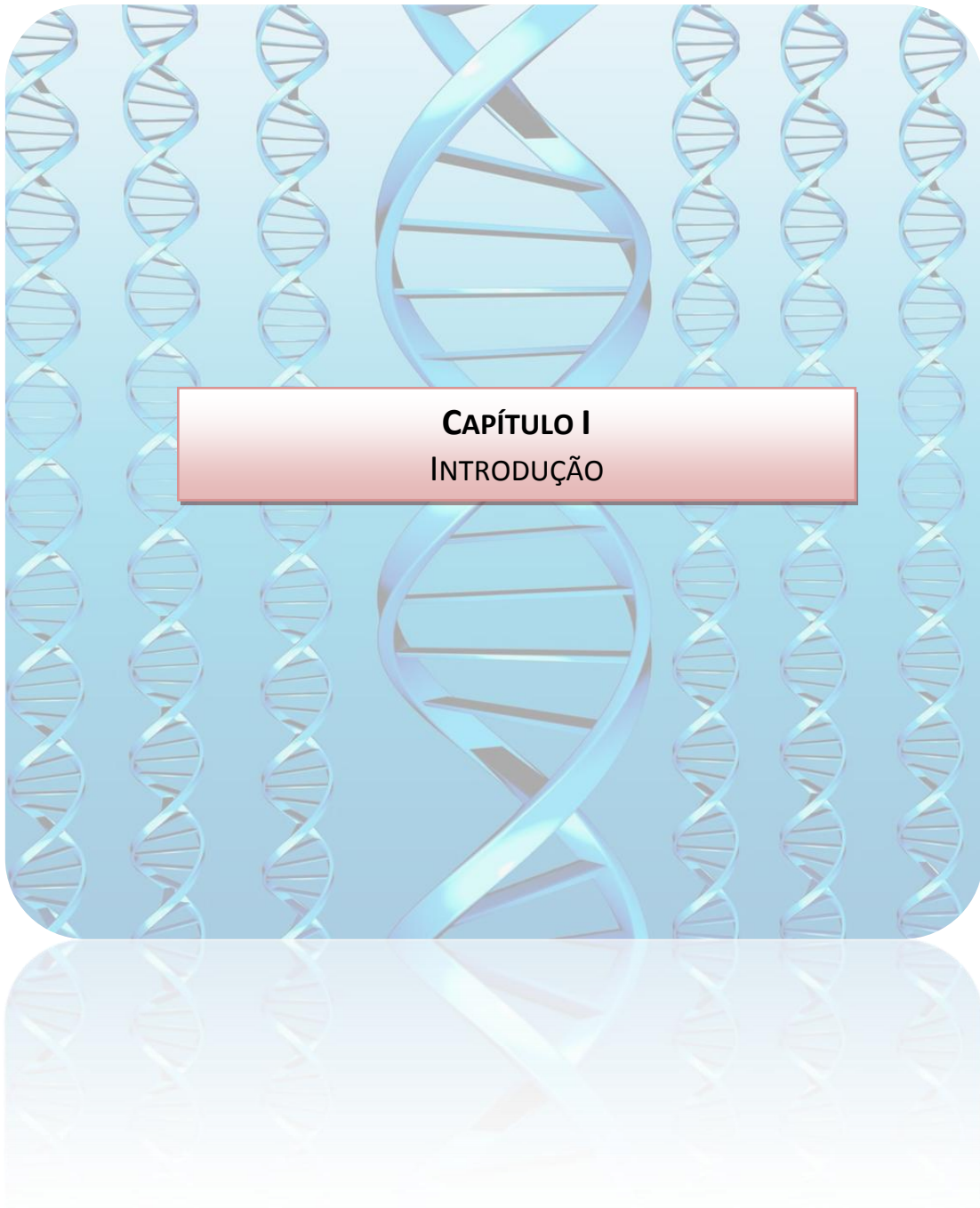
## Índice:

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	15
1. História da Medicina Legal	17
1.1 Na antiguidade	17
1.1.1 Grécia Antiga	17
1.1.2 Império Romano	17
1.1.3 Extremo Oriente	18
1.1.4 Na Europa	18
1.1.4.1 Pós-Renascentista	18
1.1.4.2 Pós-Revolução Industrial	19
1.1.5 Nos Estados Unidos da América	19
2. Medicina Legal de Portugal	21
2.1 Evolução da Medicina Legal em Portugal	21
2.1.1 Nos primórdios do Reino	21
2.1.2 Pós-Renascentismo	21
2.1.3 Pós-Revolução Industrial	21
2.1.4 No século XX	22
2.1.5 Pós-Revolução do 25 de abril	23
2.2 O Instituto Nacional de Medicina Legal de Ciências Forenses, IP	23
2.2.1 Serviço de Clínica e Patologia Forenses	24
2.2.2 Serviço de Genética e Biologia Forenses	25
2.2.3 Serviço de Química e Toxicologia Forenses	25
2.2.4 Serviço de Tecnologias Forenses e Criminalística	25
3. Genética e Biologia Forense	27
3.1 Conceito de Genótipo e Fenótipo	27
3.1.1 Genótipo	27
3.1.2 Fenótipo	27
3.2 Evolução do conceito ADN, e heretariiedade	28
3.2.1 Leis de <i>Mendel</i>	28
3.2.2 Descoberta dos ácidos nucleicos	30
3.2.3 O “ <i>processo de transformação</i> ”	30
3.2.3.1 A experiência de <i>Frederick Griffith</i>	30
3.2.3.2 A experiência de <i>Oswald Avery, Mac Leod e MacCarthy</i>	31
3.2.3.3 A experiência de <i>Martha Chase e Alfred Hershey</i>	32
3.2.4 A descoberta da estrutura do ADN	32
3.2.4.1 Modelo de Watson, Crick (e Wilkins)	33
3.2.4.1.1 Modelo da dupla hélice	33
3.3 A organização e funcionamento do ADN	34
3.3.1 Modelo para a replicação do ADN	34
3.3.2 Conceito de intrão e exão	35
3.3.3 Mutações no ADN	36
3.3.3.1 Mutação pontual	36
3.3.3.2 Mutação <i>frameshift</i>	36
3.3.3.3 Grandes mutações	37

3.3.4	Reparação de mutações	37
3.3.5	Relação Intrão e exão nas mutações	38
3.4	Identificação Pessoal	38
3.4.1	Tabela constante na Portaria 270/2009, de 17 de março	39
4.	Testes de Paternidade	41
4.1	Sistema ABO	41
4.2	Métodos Serológicos	41
4.3	Sistema HLA ou CMH	41
4.3.1	Sistema Imune	42
4.4	ADN <i>fingerprint</i>	44
4.4.1	Técnica RFLP	45
4.4.2	Técnica PCR	45
4.5	Matemática Forense	47
4.5.1	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	47
4.5.2	Índice e Probabilidade de Paternidade	48
4.5.2.1	Teorema de <i>Bayes</i>	49
4.5.3	Fórmulas simplificadas de cálculo de paternidade	50
4.5.4	Índice Avuncular	51
4.5.5	Poder de Discriminação	51
4.5.6	Poder de Exclusão	52
4.5.7	A importância das mutações aplicadas aos testes de paternidade	52
4.6	Valores usados pelos laboratórios para atribuição de paternidade	53
4.6.1	Tabela de <i>Hummel</i> (1971, desatualizada)	53
4.6.2	Tabela de <i>Hummel</i> modificada	53
4.6.3	Tabela constante no manual Qiagen® N.V.	54
5.	Prova em Tribunal	55
5.1	Prova no Processo Civil	55
5.1.1	Prova do vínculo biológico	56
5.1.2	Presunção da Paternidade	56
5.1.3	Ónus da Prova	57
5.1.4	Princípio da Cooperação	57
5.1.5	Inversão do Ónus da Prova	58
5.1.6	Contraprova	58
5.1.7	Prazo para averiguação da paternidade ou maternidade	59
5.2	Prova do Processo Penal	59
5.2.1	Produção de Prova	59
5.2.2	Princípio da Contraditoriedade	60
5.3	Cadeia de Custódia	61
CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS		63
6.	Materiais e Métodos	65

CAPÍTULO III – RESULTADOS	67
7. Resultados	69
7.1 Das consultas aos laboratórios de referência, segundo Lei 45/2004 de 19 de agosto	69
7.2 Das consultas aos outros laboratórios	70
7.3 Marcadores usados pelos testes <i>PowerPlex 16 System</i> <sup>®</sup> e <i>PowerPlex 16 HS</i> <sup>®</sup> <i>System</i>	71
7.4 Marcadores usados nos testes <i>AmpFISTR Identifiler Direct</i> <sup>®</sup> <i>PCR Amplification Kit</i> e <i>AmpFISTR Identifiler Plus</i> <sup>®</sup> <i>PCR Amplification Kit</i>	72
7.5 Marcadores usados nos testes <i>Investigator ESSplex Plus</i> <sup>®</sup> <i>Kit</i>	73
7.6 Cruzando os dados obtidos dos testes utilizados por estes laboratórios e a Portaria 270/09, de 17 de março	74
CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO	75
8. Discussão	77
CAPÍTULO V – CONCLUSÃO	79
9. Conclusão	81
CAPÍTULO VI – BIBLIOGRAFIA	83
10. Bibliografia	85
10.1 Bibliografia consultada	85
10.2 Fonte das imagens utilizadas	86
10.3 Gráfico utilizado	87
10.4 Tabelas usadas	87
CAPÍTULO VII – ANEXOS	89
11. Anexos	91







## 1. HISTÓRIA MEDICINA LEGAL

A medicina e o direito são áreas que se sobrepõem parcialmente. A primeira ligação entre elas foi estabelecida através da religião. Assim, as funções do médico e do jurista eram ligadas pelo vínculo da Igreja, neste caso específico do Padre, como intermediário entre Deus e o Homem.<sup>1</sup>

Por esse facto, os tribunais Eclesiásticos e o direito Canónico abrangiam temas relacionados com a medicina e com as ciências forenses, tais como: divórcio, gravidez, impotência, esterilidade, aborto ou a sexualidade.<sup>1</sup>

As origens das ciências Forenses remontam a tempos ancestrais. Encontram-se vestígios da sua presença em códigos legais primitivos, códigos religiosos primitivos e códigos sociais primitivos.<sup>1</sup>

O mais antigo destes códigos conhecido, datado 2200 AC (antes de Cristo), é o Código de *Hammurabi*, que incluiu legislação que regula a atividade da medicina. Este código inclui temas como a negligência médica, no qual se aplicam pela primeira vez os conceitos da responsabilidade civil e criminal para práticas médicas incorretas. Inclui ainda referências, a várias doenças que invalidavam os contratos de escravatura, ao incesto, ao adultério e à violação.<sup>1</sup>

### 1.1. Na antiguidade

#### 1.1.1. Grécia antiga

A Grécia antiga possuía um código legal desenvolvido. Vários avanços médicos já haviam sido alcançados, embora não existam provas do uso do conhecimento médico como prova em tribunal. Hipócrates e outros tinham várias publicações sobre questões médico-legais, entre elas a mortalidade provocada por ferimentos em diversas zonas do corpo, a duração média da gravidez, a taxa de mortalidade em prematuros, entre outros.<sup>1</sup>

Este avanço é corroborado pela descoberta de um papiro, que continha um relatório médico sobre um suicídio, onde se relatava a inexistência de sinais de homicídio, excluindo por isso, a hipótese de assassinato.<sup>1</sup>

#### 1.1.2. Império Romano

Durante o império Romano as ciências forenses evoluíram muito. O império contava com um conjunto de códigos legais que regulavam muita desta atividade. Por exemplo em 600 anos AC, foi aprovada uma Lei que obrigava ao salvamento do feto através de técnicas cirúrgicas, quando a mãe falecia. Existem também provas da existência de equipas de investigadores de homicídios profissionais. Aquando da morte do Imperador Júlio César, no ano de 44 AC, o médico que lhe fez a autópsia (Antístio), concluiu que somente uma das 23 facadas havia sido fatal.<sup>1</sup>

Entre 529 e 564, o império Romano oriental adotou o código de Justiniano. Este código incluía grande parte das normas herdadas pelo direito Romano. O Código estabeleceu ainda que a função do perito médico-legal era o de ajudar o juiz na

interpretação imparcial, dando a sua opinião com base no seu conhecimento especializado.<sup>1</sup>

### **1.1.3. Extremo Oriente**

Existem dados que evidenciam o reconhecimento de problemas médico-legais, no extremo oriente.<sup>1</sup>

Na China foi descoberto um volume intitulado *Hsi Yuan Lu*, datado de 1236 AC, que continha procedimentos descritivos a seguir, na investigação de mortes suspeitas. O volume continha a exigência de realização de exames completos e sistemáticos independentemente da condição do cadáver. Continha seções que se debruçavam sobre os problemas associados à existência de falsos ferimentos, de características dos ferimentos causados por golpes de punho ou de pontapé, e de morte causada por estrangulamento ou afogamento.<sup>1</sup>

Descrevia as diferenças entre cadáveres vítimas de afogamento e dos lançados na água *post-mortem* e de queimaduras *post-mortem* e *antemortem*. Referia ainda a importância a dar-se a todos os pormenores na cena do crime e ao corpo do cadáver.<sup>1</sup>

Foi ainda descoberta uma publicação sobre venenos, incluindo Arsénico ou Ópio.<sup>1</sup>

### **1.1.4. Na Europa**

#### **1.1.4.1. Pós-Renascentista**

Fruto de limitações religiosas, muito do conhecimento adquirido na antiguidade perdeu-se, tendo sido retomado somente no Renascentismo.<sup>1</sup>

Uma das primeiras tentativas de trazer de volta algum do conhecimento esquecido aconteceu na Alemanha, com a publicação do código Carolino, pelo imperador Carlos V, em 1553. O código impunha o recurso à medicina para esclarecer casos de homicídio, ferimento, envenenamento, enforcamento, afogamento, infanticídio, aborto e outras circunstâncias que envolvessem lesão à pessoa.<sup>1</sup>

A França também estabeleceu cedo um sistema médico-legal. Entre 1570 e 1692 o país publicou Leis que à semelhança da Alemanha favoreceram o desenvolvimento da medicina legal, enquanto disciplina académica.<sup>1</sup>

Infelizmente, tais avanços foram postos em causa devido a vários casos de corrupção. Esta desacreditação no sistema levou à sua regressão, e somente após a revolução Francesa o sistema médico-legal reemergiu.<sup>1</sup>

Em Itália foram publicados trabalhos sobre a medicina legal. O primeiro destes trabalhos foi *Relationes Medicorum*, publicado por *Fortunato Fedele*, em 1602. Tendo-se seguido *Questiones Medicina-Legales*, por *Paola Zacchia* médico-Papal. Este livro abrangia algumas temáticas médico-legais, como a morte durante o parto, envenenamento, impotência, violação, mutilação e as questões relativas à saúde pública.<sup>1</sup>

#### 1.1.4.2. Pós-Revolução Industrial

O primeiro livro sobre medicina legal escrito em Inglês foi de autoria de *Samuel Farr*, em 1788, intitulado *Elements of Medical Jurisprudence*. Este livro faz uma descrição sucinta e resumida das marcas no corpo humano que seriam necessárias avaliar em julgamentos, por médicos legistas. Ele abrangia diversos temas médico-legais incluindo, divórcio, violação, assassinato, entre outros.<sup>1</sup>

O primeiro professor britânico de medicina legal foi *Andrew Duncan*, professor de fisiologia, que deu vários ciclos de palestras sobre medicina legal e saúde pública, a partir de 1789. Seu filho, *Andrew Duncan, Jr.*, tornou-se o primeiro professor de medicina legal na Universidade de Edimburgo, em 1803.<sup>1</sup>

A Alemanha estabeleceu, em 1830, a sua primeira clínica médico-legal, em Viena, à data território da confederação Germânica. Tendo-se seguido uma outra em Berlim, em 1833.<sup>1</sup>

França estabeleceu a sua primeira clínica em 1840. Desde 1803 que os tribunais franceses nomeavam peritos médicos, tendo estes de ter o curso de medicina e o diploma de medicina legal. França estabeleceu o seu primeiro presidente profissional em medicina legal em 1794.<sup>1</sup>

#### 1.1.5. Nos Estados Unidos da América

Nos Estados Unidos, o primeiro professor de medicina legal foi o *JS Stringham*, que deu as suas palestras em Nova Iorque, em 1804. Em 1813, o colégio de médicos e cirurgiões de Nova Iorque criou o cargo de presidente de jurisprudência médica, sendo ocupado por *JS Stringham*.<sup>1</sup>

Em 1800, *Benjamin Rush*, um dos primeiros cirurgiões-militares do país e um dos signatários da declaração da Independência dos EUA, estabeleceu a medicina legal americana, com a publicação *On the Study of Medical Jurisprudence*.<sup>1</sup>

Em 1815, *Romeyn Beck* foi nomeado professor na Faculdade de Medicina Ocidental no estado de Nova Iorque. Em 1823, publicou *The elements of Medical-Jurisprudence*, o qual definiu o campo da medicina legal durante cerca de meio século. Este incluía temas importantes, como: violação, impotência e esterilidade, gravidez e parto, infanticídio e aborto, legitimidade, presunção de sobrevivência, identidade, alienação mental, feridas, venenos, pessoas encontradas mortas e doenças simuladas.<sup>1</sup>

Em 1860, *John Elwell* publicou um livro intitulado *The Medico-Legal Treatise on Malpractice and Medical Evidence e Insanity Comprising the Elements of Medical Jurisprudence*, onde destacou a questão da negligência na jurisprudência médica. O livro de *John Elwell* apresentava casos reais, com o intuito de ensinar os médicos o procedimento legal do litígio por negligência.<sup>1</sup>

Para os estudantes de medicina e médicos, a jurisprudência médica assumiu a posição de importância central nas escolas de medicina dos Estados Unidos durante a maior parte do séc. XIX. As instituições, Leis e decisões judiciais nos Estados Unidos

refletiram a crescente influência dos princípios médico-legais, especialmente aquelas referentes à doença mental e loucura criminal.<sup>1</sup>

Após a guerra civil, as coisas mudaram drasticamente. A Medicina legal tornou-se menos importante. Os Professores *Dean Stanford* e *Emerson Chaille* expressaram a sua visão da condição deplorável da jurisprudência médica nos Estados Unidos. Algumas faculdades de medicina abandonaram o curso por completo, outras anexaram a medicina legal a outras cadeiras, sendo por vezes, o ensino confiado a um advogado sem nenhuma formação no campo médico.<sup>1</sup>

Em 1867 foi fundada, em Nova Iorque, a *Medico-Legal Society of New York* (MLS), a primeira sociedade no mundo a ser organizada com a finalidade de promover os princípios médico-legais. Segundo a MLS, nenhum advogado está totalmente preparado para uma acusação ou defesa de um indivíduo indiciado por homicídio sem algum conhecimento de anatomia e patologia. Por outro lado nenhum médico ou cirurgião poderia ser um perito satisfatório sem algum conhecimento da Lei.<sup>1</sup>

A Universidade de Harvard estabeleceu a especialização em medicina legal em 1877.<sup>1</sup>

No início do século XX, o ensino da jurisprudência médica foi novamente relegado para uma posição secundária, ensinado fora dos temas-chave. Tendo renascido na segunda metade do século XX, como evidenciado pela fundação do *American College of Legal Medicine*, em 1955. E do reacender do interesse contemporâneo numa vasta gama de questões jurídicas e médicas, como, a ética médica, direitos dos pacientes e nos aspetos empresariais e profissionais da prática médica.<sup>1</sup>

## **2. MEDICINA LEGAL EM PORTUGAL**

### **2.1. Evolução da medicina legal em Portugal**

#### **2.1.1. Nos primórdios do Reino**

Desde o início da fundação de Portugal enquanto país, a fronteira entre a medicina e as ciências médico-legais, sempre foi muito ténue. Quando em 1290 foi fundada a Universidade de Lisboa, uma das ciências que foi ministrada foi precisamente a medicina, sendo a medicina legal desprezada durante vários séculos.<sup>2</sup>

Num país onde os curandeiros existiam com abundância e eram geralmente bem aceites pela população, os médicos formados, tinham de concorrer com “médicos” sem formação universitária cujo curso tinha sido obtido por registo da prática, passado pelo *physico-mor* do reino.<sup>2</sup>

#### **2.1.2. Pós-Renascentismo**

Portugal sempre sofreu de um atraso considerável na área médico-legal quando comparado com os seus parentes europeus. O fanatismo religioso não deixava grande margem para o progresso da medicina e da medicina legal, a ponto de, em 1671, ter sido publicada uma Lei que proibia o exercício da medicina a médicos que tenham saído reconciliados nas Inquirições de Santo Ofício.<sup>2</sup>

Tudo isto começou a mudar com a ascensão do Marquês do Pombal, que reformulou o ensino universitário em Portugal, bem como a ministração da medicina. Ainda assim, manteve-se a separação do curso de medicina e da cirurgia, que era ministrado em escolas particulares, anexas aos hospitais.<sup>2</sup>

#### **2.1.3. Pós-Revolução Industrial**

O movimento revolucionário de 1820 trouxe a monarquia constitucional e a implementação do liberalismo em Portugal. Neste período, foram efetuadas uma série de medidas reformistas que engrandeceram e aperfeiçoaram a medicina nacional.<sup>2</sup>

Em 1836, sob influência de Passos Manuel, é instituída a docência da medicina legal, e ao mesmo tempo, incluída a cadeira de medicina forense, higiene pública e política médica, nos cursos de medicina. A reforma judiciária de 1841 veio regular a intervenção dos peritos médico-legais, criando normas de acesso ao cargo, instituindo a obrigatoriedade do relato destes peritos nos crimes de morte e ferimentos.<sup>2</sup>

Em 1850, a Sociedade Farmacêutica Lusitana iniciou a toxicologia forense nacional, ao efetuar as primeiras análises químico-legais do país, em três laboratórios Porto, Coimbra e Lisboa. Estes serviços eram regulados pela Portaria 26 de janeiro de 1853, a qual impunha que se os peritos encontrassem sinais de envenenamento, deveriam declará-lo. E nesse caso conservar as vísceras em álcool para posterior análise.<sup>2</sup>

Em 1882 foi fundada em Lisboa a Sociedade das Ciências Médicas e logo de seguida a Instituição Vacínica, com o intuito de exterminar a varíola do país.<sup>2</sup>

Em 1895, o Decreto n.º 3, de janeiro, impunha a realização de exames psiquiátricos a quaisquer indivíduos que cometessem um crime em circunstâncias que se duvidasse da sua integridade mental, ou ainda, quando em defesa do criminoso existissem probabilidades de loucura. Dando assim forma, à psiquiatria forense.<sup>2</sup>

Contudo todos estes avanços pareciam não colocar a justiça a funcionar de forma célere e isenta. Existiam múltiplas falhas dos juizes e peritos, a maioria delas, originária da sua incorreta preparação para a profissão. Para conter tal falta de credibilidade foi publicada a Lei 17 de agosto, de 1899, a qual dividia o país em três circunscrições médico-legais Porto, Lisboa e Coimbra, tendo as morgues como respetivas sedes.<sup>2</sup>

Em cada uma dessas morgues funcionava um conselho médico-legal, constituído por:<sup>2</sup>

- Membros efetivos – Professores de medicina legal e de anatomia patológica, *médico alienista* e um químico analista.<sup>2</sup>
- Membros adjuntos – Professores de patologia geral, obstetrícia, toxicologia, química orgânica e química inorgânica.<sup>2</sup>

Fora das respetivas comarcas os exames periciais eram efetuados por dois médicos. Desses exames podia-se interpor recurso para o conselho médico-legal da respetiva circunscrição.<sup>2</sup>

Ficou determinado que seriam conduzidos às morgues e autopsiados todos os cadáveres encontrados fora do seu domicílio, havendo suspeitas de crime ou desconhecimento da causa de morte. Antes da remoção de qualquer cadáver, era verificado o seu óbito por um delegado ou subdelegado de saúde, ou na sua falta, por um médico que declarasse o óbito.<sup>2</sup>

A 8 de fevereiro de 1900, completou-se a legislação relativa à medicina forense, com a publicação dum questionário e das instruções que se devem observar nos exames que não forem executados pelo conselho médico-legal.<sup>2</sup>

#### **2.1.4. No século XX**

Em 1918, o Decreto nº 4808 de 11 de setembro, cria os estatutos do Instituto Nacional de Medicina Legal de Lisboa, sendo complementado pelo Decreto nº 4893, de 28 de setembro de 1918, que aprovou o respetivo regulamento, e em que se concretiza a competência do instituto e a estrutura organizativa. Nesse mesmo ano, o Decreto nº 5023, de 29 de novembro de 1918, criou o Instituto de Medicina Legal do Porto e de Coimbra.<sup>2</sup>

Os Institutos de Medicina Legal substituíram assim as morgues, criadas pela Carta de Lei de 17 de agosto de 1899.<sup>2</sup>

O Decreto-Lei 5023, de 29 de novembro de 1918, alterou:<sup>2</sup>

- Conselhos médico-legais com função de rever relatórios médico-legais de processos de crime com pena maior (superior a 2 anos);
- Os relatórios médico-legais que deixaram de ser elaborados pelos docentes universitários;

- Foi ainda criado um corpo de médicos peritos de Comarca.

### **2.1.5. Pós-Revolução do 25 de abril**

O Decreto-Lei 373/75, de 17 de julho, atribuiu a tutela dos institutos de Medicina Legal ao Ministério da Justiça, quebrando assim o vínculo destas instituições com as Faculdades de Medicina.<sup>3</sup>

O Decreto-Lei n.º 96/2001, de 26 de março, centralizou os serviços médico-legais no Instituto Nacional de Medicina Legal, criando três delegações: Porto, Coimbra e Lisboa.<sup>4</sup>

Posteriormente o Decreto-Lei 131/2007, de 27 de abril, mais tarde regulamentado pela Portaria 522/2007, de 30 de abril, veio introduzir alterações nos órgãos do instituto, criando quatro serviços técnicos: Patologia Forense, Clínica Forense, Toxicologia Forense e Genética e Biologia Forense. E trinta e um gabinetes médico-legais distribuídos pelo país.<sup>5</sup>

Em 2012, o Decreto-Lei 166/2012, de 31 de julho, veio racionalizar a estrutura do INMLCF, IP, reestruturando serviços de onde resultou uma redução do número de dirigentes e coordenadores. Foram atribuídas novas competências funcionais na área das ciências forenses,<sup>6</sup> reduzidos para 27 os gabinetes médico-legais espalhados pelo país, e também reformulados os serviços técnicos passando a vigorar quatro centrais: Clínica e Patologia Forenses, Genética e Biologia Forense, Química e Toxicologia Forense, e Tecnologia Forense e Criminalística. Foi também criado um serviço técnico descentralizado de Clínica e Patologia Forense.<sup>7</sup>

## **2.2. O Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP**

É atualmente competência do INMLCF, IP (...) *“assegurar a prestação de serviços periciais médico-legais e forenses, a coordenação científica da atividade no âmbito da medicina legal e de outras ciências forenses, bem como a promoção da formação e da investigação neste domínio, superintendendo e orientando a atividade dos serviços médico-legais e dos profissionais contratados para o exercício de funções periciais.”*<sup>6</sup>

São atribuições do INMLCF, I. P.:<sup>6</sup>

*“a) Apoiar a definição da política nacional na área da medicina legal e de outras ciências forenses;”*

*b) Cooperar com os tribunais e demais serviços e entidades que intervêm no sistema de administração da justiça, realizando os exames e as perícias médico-legais e forenses que lhe forem solicitados, nos termos da Lei, bem como prestar-lhes apoio técnico e laboratorial especializado, no âmbito das suas atribuições;*

*c) Desenvolver atividades de investigação e divulgação científicas, de formação e de ensino, no âmbito da medicina legal e de outras ciências forenses e desenvolver formas de colaboração científica e pedagógica com outras instituições;*

*d) Superintender a organização e a gestão dos seus serviços periciais forenses no território nacional;”*

- e) Programar e executar as ações relativas à formação, gestão e avaliação dos seus recursos humanos afetos às ciências forenses;*
- f) Adotar programas de garantia de qualidade aplicados aos exames e às perícias médico-legais e forenses da sua competência e promover a harmonização das suas metodologias, técnicas e relatórios periciais, nomeadamente emitindo diretivas técnico-científicas sobre a matéria;*
- g) Dirigir, coordenar e fiscalizar a atividade técnico-científica das delegações, dos gabinetes médico-legais e forenses e dos profissionais contratados para o exercício de funções periciais;*
- h) Coordenar, orientar e supervisionar a nível nacional as atividades relacionadas com as ciências forenses;*
- i) Prestar serviços a entidades públicas e privadas, bem como aos particulares, em domínios que envolvam a aplicação de conhecimentos médico-legais e de outras ciências forenses;*
- j) Assegurar a articulação com entidades similares estrangeiras e organizações internacionais;*
- k) Assegurar o funcionamento da Base de Dados de Perfis de ADN;*
- l) Programar, em colaboração com a Direção-Geral da Política de Justiça (DGPJ), as necessidades de instalações dos gabinetes médico-legais e colaborar com o Instituto de Gestão Financeira e Equipamentos da Justiça, I. P. (IGFEJ, I. P.), no planeamento e na execução de obras de construção, remodelação ou conservação;*
- m) Colaborar com a DGPJ na recolha, tratamento e divulgação de dados estatísticos relativos à atividade no âmbito da medicina legal e de outras ciências forenses, disponibilizando a informação necessária à elaboração das estatísticas oficiais na área da justiça;*
- n) Liquidar, cobrar e registar as receitas próprias”*

### **2.2.1. Serviço de Clínica e Patologia Forenses <sup>7</sup>**

*“Ao Serviço de Clínica e Patologia Forenses compete, na unidade funcional da Clínica Forense, a realização de exames e perícias em pessoas:*

- a) Para descrição e avaliação dos danos provocados na integridade psicofísica, nos diversos domínios do Direito, designadamente no âmbito do Direito penal, civil e do trabalho, nas comarcas do âmbito territorial de atuação da delegação;*
- b) De natureza psiquiátrica e psicológica forenses;*
- c) Outros atos neste domínio, designadamente avaliações de natureza social.”*

*“Ao Serviço de Clínica e Patologia Forenses compete, na unidade funcional de Patologia Forense, a realização dos seguintes exames e perícias:*

- a) Autópsias médico-legais respeitantes aos óbitos verificados nas comarcas do âmbito territorial de atuação da delegação;*
- b) Exames de anatomia patológica forense no âmbito das atividades da delegação e dos gabinetes médico-legais que se encontrem na sua dependência, bem como a solicitação das autoridades e entidades para o efeito competentes, e do presidente do conselho diretivo;”*

*“c) Outros atos neste domínio, designadamente perícias de identificação de cadáveres e de restos humanos, de embalsamamentos e de estudo de peças anatómicas.”*

### **2.2.2. Serviço de Genética e Biologia Forenses <sup>7</sup>**

*“Ao Serviço de Genética e Biologia Forenses compete assegurar, a nível nacional, a realização de perícias e exames de identificação genética, nomeadamente os de investigação biológica de parentesco, de identificação individual, de criminalística biológica ou outros, no âmbito das atividades das delegações e dos gabinetes médico-legais, bem como a solicitação das autoridades e entidades para o efeito competentes, ou do presidente do conselho diretivo. (...) Compete ainda ao Serviço de Genética e Biologia Forenses emitir pareceres e prestar assessoria técnico-científica no domínio das suas competências”*

### **2.2.3. Serviço de Química e Toxicologia Forenses <sup>7</sup>**

*“Ao Serviço de Química e Toxicologia Forenses compete assegurar, a nível nacional, a realização de perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, no âmbito das atividades das delegações e dos gabinetes médico-legais, bem como a solicitação das autoridades e entidades para o efeito competentes, ou do presidente do conselho diretivo. (...) Compete ainda ao Serviço de Genética e Biologia Forenses emitir pareceres e prestar assessoria técnico-científica no domínio das suas competências.”*

### **2.2.4. Serviço de Tecnologias Forenses e Criminalística <sup>7</sup>**

*“Ao Serviço de Tecnologias Forenses e Criminalística compete assegurar, a nível nacional, no âmbito dos diversos domínios do Direito, e das atividades das delegações e dos gabinetes médico-legais, bem como a solicitação das autoridades para o efeito competentes, a pesquisa, registo, colheita e tratamento de vestígios, e a realização de perícias nas diferentes áreas das ciências forenses não enquadráveis nas competências dos restantes serviços técnicos, designadamente e entre outras, no âmbito da análise de escrita e documentos, balística e física. (...) Compete ainda ao Serviço de Genética e Biologia Forenses emitir pareceres e prestar assessoria técnico-científica no domínio das suas competências.”*



### 3. GENÉTICA E BIOLOGIA FORENSE

A Biologia é a ciência que estuda os seres vivos. O termo vem do Grego *bios*, que significa vida e *logos* que significa estudo. A Genética é um ramo da Biologia. O termo também advém do Grego *genno*, que significa fazer nascer. Ou seja, a Genética é a ciência da hereditariedade, sendo esta regida pelos genes e sua informação.<sup>8</sup>

Todos os seres vivos são constituídos por células, tendo praticamente todas elas ADN. Nos organismos mais simples o ADN está disperso pelo citoplasma (procariotas), ao passo, que nos seres complexos o mesmo se encontra dentro do núcleo da célula (eucariotas).<sup>8</sup>

Nos eucariotas, o ADN organiza-se em genes e os genes em cromossomas. Na reprodução sexuada os cromossomas são separados durante o processo de meiose, e novamente juntos na fecundação, originando desta forma, uma grande variedade do património genético.<sup>8</sup>

O ADN é composto por duas cadeias polinucleótidas, sendo cada nucleótido, constituído por uma base azotada, um açúcar (pentose) e um grupo fosfato. As bases azotadas podem ser quatro, a Timina, Citosina, Guanina ou Adenina.<sup>8</sup>

Esta molécula apresenta três características:

- Exclusividade, cada indivíduo tem o seu próprio genoma não existindo dois iguais;
- Igualdade, todas as células nucleadas apresentam o mesmo ADN;
- Invariabilidade, ele não varia ao longo da vida.

#### 3.1. Conceito de genótipo e fenótipo

Estes conceitos foram empregues pela primeira vez pelo Botânico Dinamarquês, *Wilhelm Johannsen*.<sup>8</sup>

##### 3.1.1. Genótipo

O conceito genótipo deriva do Grego *genos* origem e *typos* característica. Este termo é usado na referência à constituição genética de um indivíduo, ou seja, ao seu património genético.<sup>8</sup>

##### 3.1.2. Fenótipo

O termo deriva do Grego *pheno* evidente e *typos* característico. Este termo é usado para designar as características morfológicas, fisiológicas e comportamentais evidenciadas num indivíduo. Ou seja, o fenótipo resulta da expressão do genótipo devidamente modificado pelo meio ambiente. O fenótipo é também alterável pelo tempo.<sup>8</sup>

### 3.2. Evolução do conceito ADN, e hereditariedade

#### 3.2.1. Leis de *Mendel*

Mendel a partir da autopolinização criou estirpes de ervilheiras que considerou “puras”. Isto é, a partir da observação de uma das características, ele conseguia antever as restantes. *Mendel* no estudo observou várias características da planta como a cor da flor, posição da flor no caule, cor da semente, aspeto externo da semente, forma da vagem, cor da vagem e altura da planta.<sup>8</sup>

Após obter estas estirpes “puras”, *Mendel* efetuou cruzamentos entre estirpes diferentes. No experimento *Mendel* observou que do cruzamento de dois espécimes distintos (Amarelo x Verde), resultavam sempre sementes Amarelas (1ª Geração). Sendo que na segunda geração obtinha  $\frac{3}{4}$  Amarelas e  $\frac{1}{4}$  Verde.<sup>8</sup>

Concluiu então que a cor Amarela era a dominante e a Verde recessiva e que embora na 1ª geração o Verde não se tivesse manifestado, o “gene” que originou a coloração estava lá. Para esquematizar o sucedido, *Mendel* usou letras, sendo o V (amarelas, dominante) e o v (verdes, recessivo). Assim através do cruzamento do resultado da experiência, ele concluiu que estava perante três tipos de sementes. As Amarelas (VV), as híbridas (Vv) (que também eram Amarelas) e as Verdes (vv).<sup>8</sup>

A partir destas observações *Mendel* formulou a sua primeira Lei - A Lei da Segregação. Esta Lei diz que na formação dos gâmetas, os pares de alelos segregam-se, voltando a unir-se com a fecundação. Aí, existirá um que se expressará - o dominante (representado por letra maiúscula). O outro - o recessivo - apenas se expressará na ausência do dominante (representado por letra minúscula), conforme o quadro exemplificativo:<sup>8</sup>

Primeira Geração	v	v
V	Vv	Vv
V	Vv	Vv

Segunda Geração	V	v
V	VV	Vv
v	Vv	vv

Tabela 1 – Exemplificação das experiências de Mendel, na primeira e segunda geração.

Na primeira geração seriam todas híbridas, onde somente se expressariam Amarelas (alelo dominante). E na segunda geração, as sementes seguiriam um padrão  $\frac{3}{4}$  com características do alelo dominante e  $\frac{1}{4}$  com características do alelo recessivo.<sup>8</sup>



### 3.2.2. A descoberta dos ácidos nucleicos

Em 1869, o *Johannes Friedrich Miescher*, médico Suíço, identificou com sucesso uma substância extraída do núcleo dos espermatozoides de Salmão. Essa nova substância tinha um elevado peso molecular, tendo dado o nome de “nucleína”.<sup>8</sup>

Entre 1885 e 1901, um bioquímico alemão, *Ludwing Karl Martin Leonhard Albrecht Kossel*, demonstrou que a “nucleína” continha bases azotadas na sua estrutura, tendo identificado cinco tipos diferentes: a Timina, Citosina, Adenina, Guanina e Uracilo.<sup>8</sup>

Em 1889, o bioquímico *Richard Altman*, conseguiu obter uma amostra isolada de ADN com elevada pureza e constatou a sua natureza ácida tendo designado por ácido nucleico.<sup>8</sup>

Em 1902, *Walter Stanborough Sutton*, médico e geneticista Americano, reparou na semelhança de comportamento dos cromossomas homólogos na meiose e associou às Leis de *Mendel*.<sup>8</sup>

Em 1912, *Phoebus Aaron Theodore Levene*, bioquímico Lituano-Americano, identificou com sucesso a constituição do componente básico dos ácidos nucleicos. A estrutura era composta numa base azotada ligada a uma pentose e a um grupo fosfato. Esta unidade foi denominada de nucleótido.<sup>8</sup>

### 3.2.3. O processo de transformação

#### 3.2.3.1. A experiência de *Frederick Griffith*

*Frederick Griffith* foi um médico militar Britânico, com especialidade em microbiologia. Na sequência de inúmeras mortes provocadas por pneumonias na primeira grande guerra, realizou uma experiência, onde usava uma estirpe virulenta que tinha uma cápsula polissacárida, conferindo uma aparência lisa (tipo S, do Inglês *Smooth*), e uma estirpe não virulenta sem cápsula polissacárida escolhida propositadamente por apresentar uma superfície rugosa (tipo R, do Inglês *Rough*), esta estirpe cresce em ratos não lhes sendo fatal.<sup>8,9</sup>

*Frederick Griffith* realizou então quatro experimentos, administrados a quatro ratos:<sup>8,9</sup>

- Ao primeiro grupo uma injeção com bactérias tipo S;
- Ao segundo grupo uma injeção com bactérias tipo R;
- Ao terceiro grupo uma injeção com bactérias tipo S inativadas pelo calor;
- E ao quarto grupo uma injeção com bactérias tipo S inativadas pelo calor, mais bactérias do tipo R vivas.

Conforme a seguinte figura:

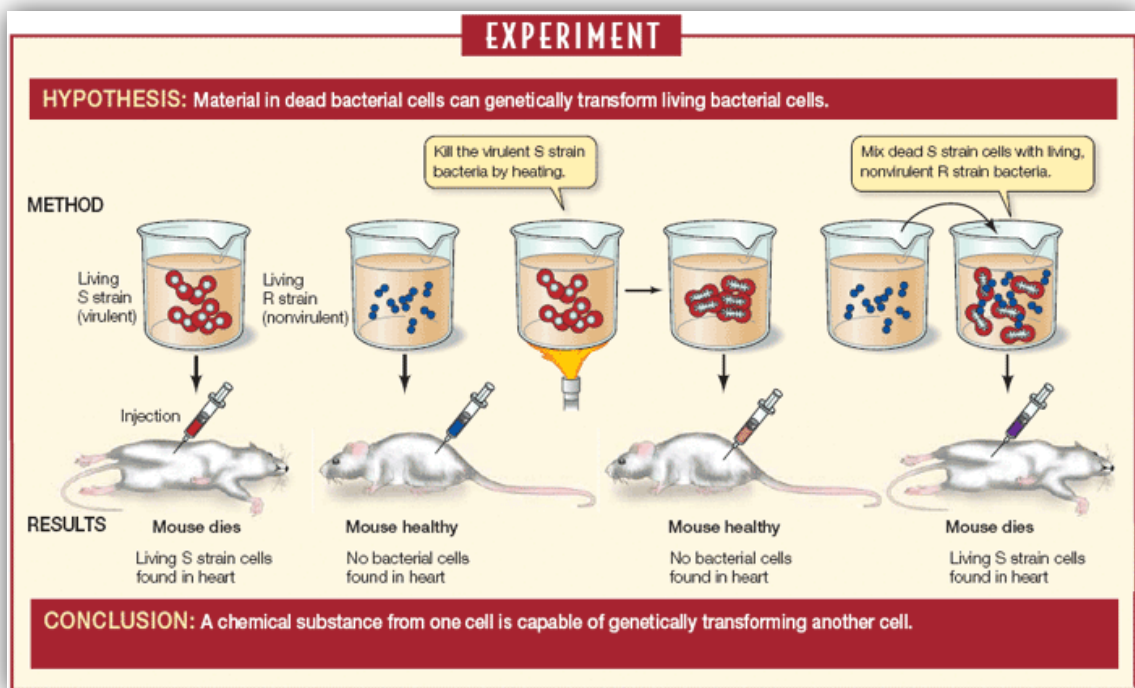


Figura 2 – Exemplificação da experiência de *Frederick Griffith*.

Como resultado da experiência, os ratos do grupo 2 e 3 sobreviveram, e os ratos do grupo 1 e 4 morreram.<sup>8,9</sup>

Assim, *Frederick Griffith* concluiu que algo presente nas bactérias S inativas, revertia a virulência das bactérias R, tornando-as virulentas. E concluiu que não poderia ser a cápsula. Chamou a este “processo de transformação”.<sup>8,9</sup>

### 3.2.3.2. A experiência de *Oswald Avery, MacLeod e McCarty*

Mais tarde, em 1928, *Oswald Theodore Avery* (médico e bioquímico Norte-americano), *Colin Munro MacLeod* (geneticista, Canadiano e Norte-Americano) e *Maclyn McCarty* (geneticista Norte-Americano), desenvolveram uma experiência idêntica à anterior, mas substituíram as bactérias R vivas (no quatro grupo) por uma solução de proteínas, glícidos, lípidos e por ácidos nucleicos, obtidas através de lisado de colónias R.<sup>8,9</sup>

Esta equipa de investigadores verificou que somente as bactérias S inativadas, mais os ácidos nucleicos provocavam a morte do rato. Descobrendo que o “processo de transformação” era realizado pelo ADN.<sup>8,9</sup>

### 3.2.3.3. Experiências de *Martha Chase* e *Alfred Hershey*

Em 1952, as experiências de *Martha Cowles Chase* (geneticista Norte-Americana) e *Alfred Day Hershey* (microbiologista Norte-Americano) corroboram a ligação entre o ADN e o “processo de transformação”.<sup>8,9</sup>

Nesta experiência, infetaram bactérias (*Escherichia coli*) com vírus previamente produzidos num meio contendo <sup>35</sup>S (átomo que o ADN não possui). Numa segunda experiência infetaram bactérias (*Escherichia coli*) produzidas previamente num meio contendo <sup>32</sup>P (átomo que as proteínas não possuem).<sup>8,9</sup>

Mais tarde, analisaram as bactérias infetadas e detetaram que no meio I estas não emitiam sinal radioativo, ao contrário do meio II.<sup>8,9</sup>

Assim, concluiu-se que os vírus tinham transmitido ADN para as bactérias, obrigando estas a produzir novos vírus. Ou seja, esta experiência corroborou a anterior, identificando o ADN como suporte físico do material hereditário.<sup>8,9</sup>

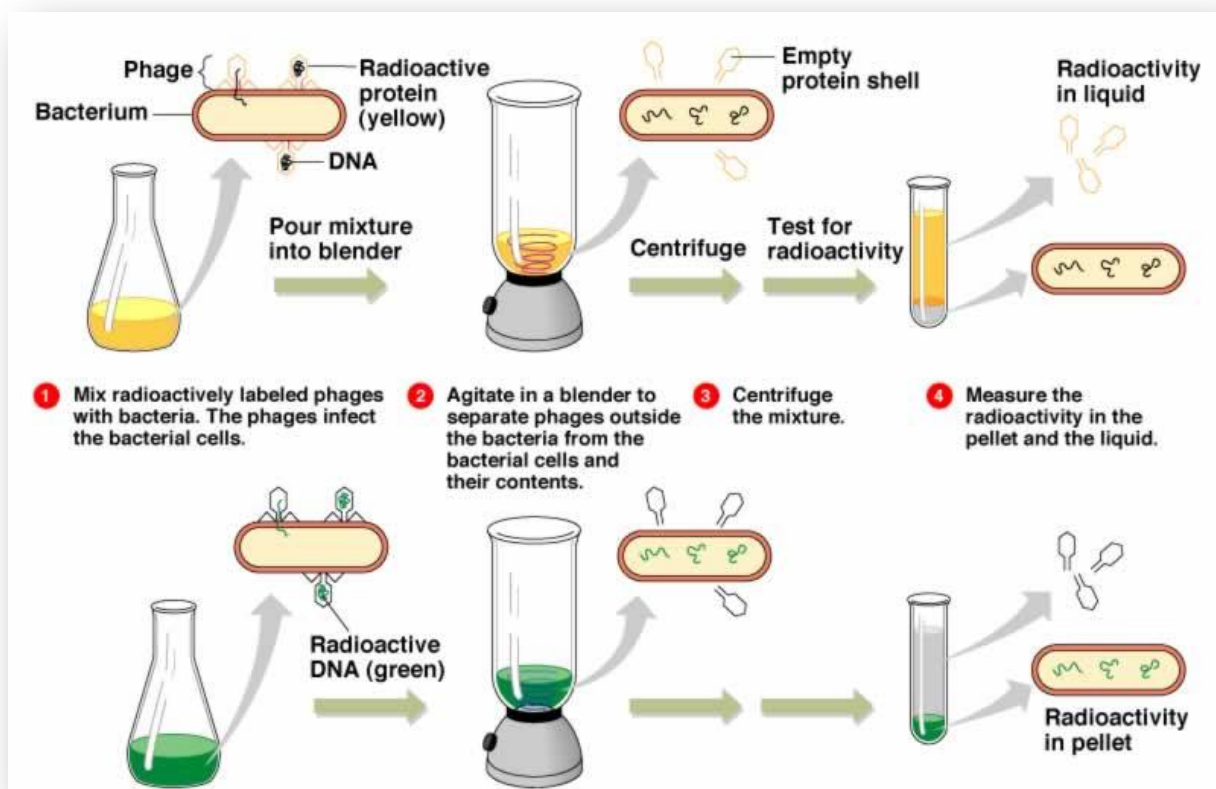


Figura 3 – Exemplificação da experiência de *Martha Cowles Chase* e *Alfred Day Hershey*.

### 3.2.4. A descoberta da estrutura do ADN

*James Michael Creeth* no desenvolvimento do seu doutoramento verificou que as cadeias de ADN poderiam estar unidas por pontes de hidrogénio, após observar alterações na viscosidade do ADN aquando da aplicação de um tratamento destruidor das pontes de Hidrogénio.<sup>8,9</sup>

Em 1950, *Erwin Chargaff* (bioquímico Austríaco) observou que as quantidades de Adenina eram sensivelmente idênticas à de Timina e a de Citosina às de Guanina, sugerindo que ambas poderiam estar unidas.<sup>8,9</sup>

Em 1951, *Rosalind Franklin*, uma biofísica Britânica, concluiu que a molécula de ADN teria uma forma helicoidal, ao fazer incidir um feixe de raios X num cristal de ADN.<sup>8,9</sup>

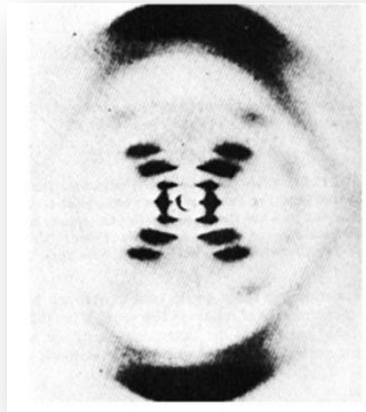


Figura 4 – Imagem de raio X obtida por *Rosalind Franklin*.

#### 3.2.4.1. Modelo de Watson, Crick (e Wilkins).

*Francis Harry Compton Crick* era um biólogo molecular Inglês, biofísico e neurocientista. *James Dewey Watson* um biólogo molecular, geneticista e zoólogo Americano, e *Maurice Hugh Frederick Wilkins* um físico e biólogo molecular Inglês, nascido na Nova Zelândia.<sup>8,9</sup>

##### 3.2.4.1.1. Modelo da Dupla hélice

Numa primeira abordagem *Watson* e *Crick*, baseados na informação disponível, construíram um modelo com os grupos fosfato virados para o centro da molécula, modelo esse que terá sido contrariado por observações efetuadas por *Rosalind Franklin*.<sup>8,9</sup>

- Experiências anteriores haviam mostrado que as bases azotadas não eram acessíveis pelo exterior;
- As unidades estruturais do ADN eram progressivamente separadas por adição de água, formando um gel e, em seguida, uma solução.

*Rosalind Franklin* acreditava então que a explicação mais simples seria a parte hidrófila da molécula estar virada para o exterior.<sup>8,9</sup>

Através dos dados obtidos, *Watson* e *Crick*, chegaram a três noções fundamentais:<sup>8,9</sup>

- Os dados de difração por raios X evidenciaram que a cadeia de ADN tinha aproximadamente 2 nm constantes, a hélice 3,4nm e que cada nucleótido distancia 0,34nm entre si. Por esta razão calcularam que existiam 10 bases por volta.
- A densidade do ADN sugere que a hélice deveria conter duas cadeias polinucleótidas e como o diâmetro é constante, sugeria ainda que as cadeias estariam unidas pelas bases azotadas, permitindo assim manter o intervalo constante.
- Independentemente da quantidade existente de cada base existia também uma correlação que se mantinha.  $(T+C)/(A+G) = 1$ .

Com base nestas três conclusões protocolaram que:<sup>10</sup>

- As duas hélices estariam ligadas por pontes de hidrogénio que se estabeleceriam entre as bases azotadas, estando a Timina ligada à Adenina por duas pontes de hidrogénio, e a Citosina com a Guanina através de três pontes.
- As cadeias estariam assim emparelhadas em direções opostas (antiparalelas), uma na direção 5'→3' e a outra na direção 3'→5'.

Assim juntos, *Watson* e *Crick*, desenvolveram um modelo que se baseava numa estrutura helicoidal, que foi publicada em 1953. Esta descoberta foi reconhecida com a entrega do prémio Nobel da Medicina em 1962, a *Watson*, *Crick* e *Wilkins*.<sup>9,10</sup>

### 3.3. A organização e funcionamento do ADN

#### 3.3.1. Modelo para a replicação do ADN

Para que seja possível a transmissão do património genético, o mesmo tem de ser replicável.

*Watson* e *Crick* indicaram o modelo semiconservativo. Atualmente este modelo é aceite como o correto.<sup>8,9</sup>

Baseia-se nas seguintes premissas:<sup>8,9</sup>

- As cadeias são separadas aquando da replicação, através de enzimas que quebram as pontes de hidrogénio (helicase).
- Cada cadeia serve de molde à formação de uma nova cadeia complementar;
- Formam-se simultaneamente duas cadeias, de acordo com a complementaridade das bases.
- A replicação ocorre sempre no sentido 5' → 3'.

Este modelo é suportado pela experiência de *Meselson e Stahl*:

*Matthew Stanley Meselson* (geneticista Norte-Americano) e *Franklin William Stahl* (biólogo molecular e geneticista Norte-Americano) realizaram uma experiência onde cultivaram *Escherichia coli* num meio de cultura com Azoto pesado ( $^{15}\text{N}$ ), sendo esse Azoto integrado no ADN das bactérias.<sup>8, 9</sup>

De seguida, as colónias foram transferidas para um meio contendo  $^{14}\text{N}$ . Como resultado, observou-se que 20 minutos após este facto, na 1ª Geração, o ADN tinha perdido densidade. Na 2ª geração tinha-se gerado ADN isento de  $^{15}\text{N}$ , corroborando assim a validade do modelo semiconservativo.<sup>8, 9</sup>

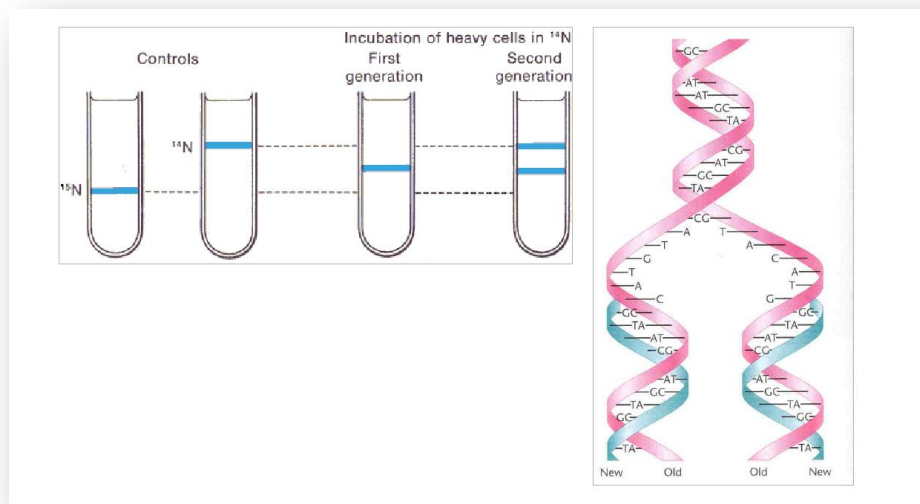


Figura 5 - Experiência de *Meselson e Stahl*.

### 3.3.2. Conceito Intrão e exão

Os genes estão organizados em exões e intrões. O intrão foi descoberto independentemente por *Phillip Allen Sharp* (biólogo molecular e geneticista Americano) e *Richard J. Roberts* (biólogo molecular e geneticista Inglês), ao verificarem que a sequência proteica e conseqüentemente de mRNA não correspondiam à cadeia de ADN, que havia servido de molde. Estas sequências foram descobertas em todos os organismos eucariotas. O termo intrão foi pela primeira vez referido por *Walter Gilbert*, em 1978.<sup>9</sup>

A frequência com que ocorrem intrões é muito variável em diferentes genomas de diferentes organismos, sendo muito frequentes na espécie Humana.<sup>9</sup>

- Os exões são definidos como sequências do *pré-mRNA* que estão representadas no *mRNA*;
- Os intrões são definidos como sendo sequências do *pré-mRNA* que são removidas, não estando por isso representadas no *mRNA*.

Os intrões podem ser classificados como:<sup>9</sup>

- Intrões que codificam proteínas e que são removidos por *spliciosomas*;

- Intrões que codificam tRNA e que são removidos por enzimas;
- Intrões que efetuam *auto-splicing* (Grupo I) e que são removidos por catálise de ARN;
- Intrões que efetuam *auto-splicing* (Grupo II) e que são removidos por catálise de ARN.<sup>9</sup>

### 3.3.3. Mutações no ADN

As mutações do ADN podem ocorrer por diversos mecanismos. Os mais comuns são processos físicos, como por exemplo a radiação ionizante, processos químicos através de substâncias que têm a capacidade de interagir com o ADN, podendo danificá-lo, como agentes alquilantes ou radicais livres, processos biológicos, como vírus que adicionam ou alteram o ADN de uma célula, ou podem ocorrer casuisticamente durante o processo de replicação do ADN.<sup>9</sup>

As mutações genéticas podem ocorrer em várias regiões do ADN, podendo ser silenciosas ou causar danos.

As mutações são classificadas, em:<sup>9</sup>

#### 3.3.3.1. Mutação pontual

São mutações de pequena escala, onde se dá a troca de um único nucleótido por outro. A mais comum ocorre quando há a troca de uma purina por outra purina ou uma pirimidina por outra pirimidina. Se ocorrer dentro de um exão, elas podem ser ainda classificadas como:

Mutação Silenciosa: O codão codifica para o mesmo aminoácido.<sup>9</sup>

Mutação Missense: Codifica para um aminoácido diferente.<sup>9</sup>

Mutação Nonsense: Codifica para um codão *stop*, provocando o término prematuro aquando da tradução.<sup>9</sup>

#### 3.3.3.2. Mutação *Frameshift*

São mutações onde ocorre a inserção ou deleção de uma ou mais bases. Originam uma sequência de leitura genómica diferente.<sup>9</sup>

Inserção: ocorre pela adição de um ou mais nucleótidos na sequência de ADN.<sup>9</sup>

Deleção: há a remoção de um ou mais nucleótidos da sequência de ADN.<sup>9</sup>

### 3.3.3.3. Grandes Mutações

Podem alterar a estrutura do cromossoma: <sup>9</sup>

Amplificação: criação de uma ou várias cópias de uma região do cromossoma. <sup>9</sup>

Deleção de regiões cromossómicas: levando à perda dos genes presentes nessas regiões. <sup>9</sup>

- União genómica: acontece quando existe a deleção de uma parte do genoma. Os mecanismos de reparação, no sentido de reporem a normalidade cromossómica, unem as pontas soltas podendo dar origem à união de dois genes diferentes.
- Translocação cromossómica: quando o fenómeno de *crossing-over* ocorre entre cromossomas não homólogos.
- Inversão cromossómica: Ocorre a inversão da orientação de um segmento do cromossoma, ficando o gene ao contrário.
- Perda de heterozigidade: Há perda de um alelo por deleção ou recombinação num organismo que originalmente possuía dois alelos.

### 3.3.4. Reparação de mutações

Devido à importância da conservação do código genético, os organismos evoluíram no sentido de proteger o seu ADN, reparando-o de danos ou erros na sua leitura. <sup>9</sup>

Os mecanismos de reparação do ADN podem ser divididos em três grandes classes:

- Reparação *Mismatch* – ocorre imediatamente após a síntese do ADN e utiliza a outra cadeia como molde. <sup>9</sup>
- Reparação por excisão – compreende a remoção de uma região danificada por sistemas de nucleases especializadas e de seguida, a síntese de novo ADN para preenchimento da região removida. <sup>9</sup>
- Reparação de quebras de cadeia dupla – são processos de reparação que levam à união das duas extremidades da cadeia de ADN quebrada. <sup>9</sup>

Estes modelos de reparação embora eficazes, não são 100% eficazes e por essa razão, com o passar de gerações existirão um acumular de mutações do ADN. <sup>9</sup>

### **3.3.5. Relação intrão e exão nas mutações**

Teoricamente as mutações ocorrem de forma aleatória e imprevista, podendo por essa razão atingir as mais diversas regiões do ADN e afetar intrões ou exões. Contudo elas são mais eficientemente removidas dos exões por seleção negativa.<sup>9</sup>

Assim um intrão é capaz de acumular mais mutações, existindo por isso, uma maior variância no ADN dos intrões nas diferentes espécies.<sup>9</sup>

Para além desta casuística, os intrões, nomeadamente as regiões repetitivas dos intrões são mais sujeitas a erros na leitura por parte da *DNApolimerase*. Este fenómeno é chamado de deslizamento da *DNApolimerase* e em parte explica a maior variância existente no número de repetições desta região particular do ADN.<sup>9</sup>

### **3.4. Identificação pessoal**

Devido à maior variância nos intrões, algumas destas regiões foram estudadas e registadas para efeito de identificação pessoal. As primeiras regiões a serem usadas foram as regiões STR (*Short Tandem Repeats*). Estas zonas consistem em repetições de tripletos ou de quadrupletos, havendo uma elevada variação entre indivíduos. Posteriormente foram usadas regiões VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), que apresentam sequências mais longas do que as STR e que vão de 16 a 70 pares de bases.<sup>9</sup>

Em Portugal a Lei 5/2008, de 12 de fevereiro, aprovou a criação de uma base de dados com os perfis de ADN, para a identificação civil e criminal. Os marcadores usados para este fim, estão regulamentados na Portaria 270/2009, de 17 de março, que estabelece quais os marcadores que estão incluídos nesta base de dados.<sup>11</sup>

A gestão desta base de dados é uma das novas competências do INMLCF, IP segundo o Decreto-Lei 166/2012, de 31 de julho.<sup>6</sup>

**3.4.1. Tabela constante na Portaria 270/2009, de 17 de março <sup>11</sup>**

Lei de 5/2008, de 12 de fevereiro, regulamentada pela Portaria 270/2009, 17 de março	
Amelogenina	<b>Marcadores de inserção obrigatória</b>
FGA	
THO1	
vWA	
D3S1358	
D8S1179	
D18S51	
D21S11	
CD4	<b>Marcadores de inserção complementar</b>
CSF1P0	
F13A1	
F13B	
FES	
GABA	
Penta D	
Penta E	
TPOX	
SE33	
D2S1338	
D5S818	
D7S820	
D13S317	
D16S539	
D19S433	

Tabela 2 – Portaria 270/2009, de 17 de março.



## 4. TESTES DE PATERNIDADE

Desde há longos séculos, sempre houve casos menos claros de paternidade, onde pouco mais restava aos pais, que confiar na fidelidade da respetiva esposa. No fim do século XIX, tal situação começou a mudar. Como referido, *Mendel* descreveu as suas duas Leis da hereditariedade em 1865-66.<sup>8,9</sup>

### 4.1. Sistema ABO

As Leis de *Mendel* serviram de base para *Karl Landsteiner*, um médico e biólogo Austríaco, perceber de que modo ocorria a transmissão das proteínas de superfície dos eritrócitos quando classificou o sistema ABO, em 1901. Deste modo *Karl Landsteiner* descreveu o primeiro teste científico para averiguar a paternidade, ao determinar a compatibilidade entre o fenótipo das proteínas à superfície dos eritrócitos do pai e do filho.<sup>8,9</sup>

### 4.2. Métodos serológicos

Em 1937, foi descoberto o fator Rh por *Karl Landsteiner* e *Alexander S. Wiener*. O fator Rh é também ele transmitido de pais para filhos, e pode estar presente ou ausente. Assim através da comparação do fator Rh dos descendentes com o dos progenitores poderia ser possível determinar a compatibilidade entre eles e assim estabelecer com maior certeza a paternidade.<sup>12</sup>

Mais tarde, foram acrescentados os antigénios de *Duffy* e de *Kell*. O antigénio de *Duffy* está localizado na superfície dos eritrócitos. Este antigénio é também conhecido por glicoproteína *Fy* ou CD234. Estão identificados seis antigénios diferentes (*Fy-a*, *Fy-b*, *Fy-3*, *Fy-4*, *Fy-5* e *Fy-6*).<sup>12</sup>

O antigénio de *Kell* é uma proteína que se encontra na superfície dos eritrócitos. Este antigénio é uma glicoproteína, também conhecida por CD238. Estão identificados três antigénios diferentes (*K*, *k* e o *Kp*).<sup>12</sup>

Os exames serológicos para a determinação da paternidade foram muitos usados no passado, mas não permitem uma certeza superior a 40%.<sup>12</sup>

### 4.3. Sistema HLA ou CMH

Em 1952, um imunologista Francês, *Jean Dausset*, descreveu o sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), atualmente designado de CMH (Complexo Major de Histocompatibilidade). Este sistema quando aplicado aos testes de paternidade permite obter resultados com muito mais exatidão que o sistema ABO.<sup>13</sup>

O sistema era baseado na comparação entre os antigénios à superfície dos leucócitos do filho(a) com o dos respetivos pais, que descobriu serem transmitidos em bloco (um paterno e outro materno).<sup>13</sup>

## Sistema Imune

O sistema imune é vital para a sobrevivência das espécies, protegendo-as do mundo exterior. Ele é constituído pela imunidade nata e imunidade adquirida: <sup>13</sup>

A imunidade inata é composta por quatro barreiras defensivas: <sup>13</sup>

- Anatómica: pele, mucosas;
- Fisiológica: temperatura, pH ácido do estômago;
- Fagocitária e endocitária: monócitos, neutrófilos, macrófagos;
- Resposta Inflamatória.

A imunidade adquirida é, ao contrário da inata, dirigida contra alvos específicos. Este tipo de resposta apresenta quatro características: <sup>13</sup>

- Especificidade antigénica: a resposta é dirigida apenas sobre determinado antígeno;
- Diversidade: existe uma grande diversidade nas moléculas de reconhecimento, o que permite reconhecer milhares de estruturas específicas sobre os antígenos;
- Memória imunitária: o sistema imune reconhece o mesmo antígeno mais rapidamente numa segunda infeção, o que permite uma resposta mais rápida;
- Reconhecimento do Próprio e do Não Próprio: o sistema imune consegue distinguir o que pertence ao próprio organismo e o que não pertence.

O reconhecimento do Próprio e do Não Próprio, envolve quatro moléculas de membrana, que interatuam entre si: <sup>13</sup>

- Anticorpos de membrana células B;
- Recetores de membrana das células T;
- CMH Classe I é constituído por uma cadeia leve e outra pesada ligada à proteína  $\beta$ 2-microglobulina e é expresso por quase todas as células nucleadas;
- CMH Classe II é constituído por duas glicoproteínas, mais duas  $\beta$ 2-glicoproteínas. Estão somente expressas nas APC (Células Apresentadoras de Antígeno).

Como evidenciado, o CMH cumpre funções de reconhecimento, diferenciação e defesa. Dentro do CMH diferenciam-se três regiões que agrupam genes chamados de classe I, II e III respetivamente. O CMH é codificado por vários genes localizados no cromossoma 6, conforme a seguinte figura: <sup>13</sup>

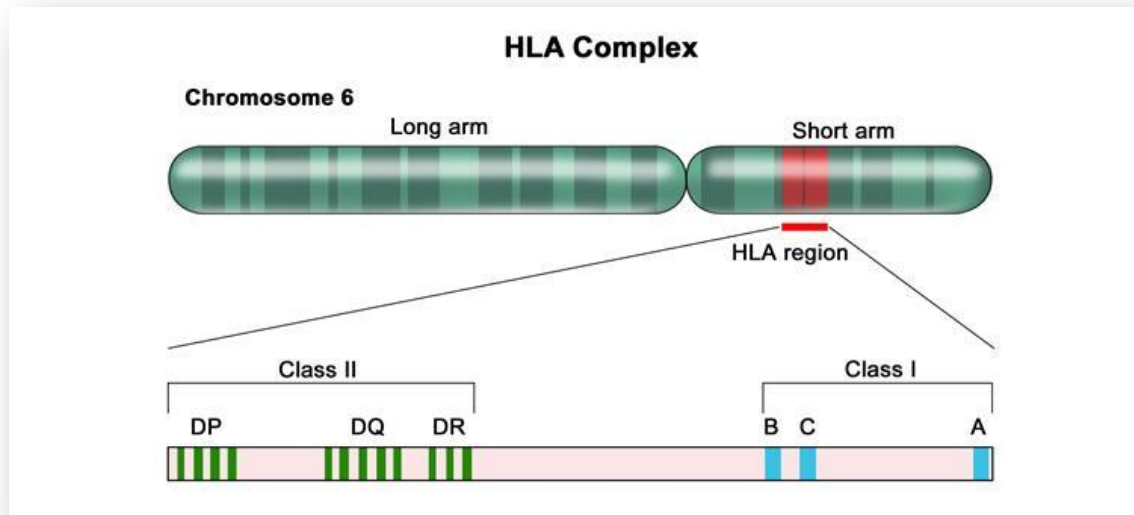


Figura 6 – Imagem do cromossoma 6 com a localização dos loci do cromossoma 6.

- **CMH-I** – coloniza a membrana de quase todas as células do organismo com exceção dos eritrócitos. Existem três subgrupos ou loci principais, CMH I-A, B e C chamados clássicos. Outros, que são menos polimórficos e se expressam menos, são os CMH I-E, F, G, H e J. O CMH-I A, B e C podem ser reconhecidos por métodos serológicos, utilizando soros ricos em anticorpos contra alguma das especificidades da molécula do CMH-I. A classificação faz-se por meio de PCR, utilizando sondas específicas para cada alelo.<sup>13</sup>
- **CMH-II** – ao contrário do que ocorre com os antígenos da classe I, os antígenos da classe II apenas são expressados nos linfócitos B, nos macrófagos, nas células dendríticas, nas células de *Langerhans*, em algumas células epiteliais e numa percentagem pequena na subpopulação de Linfócitos T-helper. As restantes células e quase a totalidade dos linfócitos T carecem destes antígenos de classe II. O CMH-II está subdividido em vários subgrupos. Os principais e mais variáveis são o CMH II- DP, DQ e DR. Existindo outros menos variáveis DZ, DO, DN e DM.<sup>13</sup>
- **CMH-III** – Ao contrário das moléculas do CMH I e II, as moléculas do CMH-III são um conjunto de proteínas não relacionadas entre si, e que não partilham semelhança estrutural e função com as moléculas de classe I e II.<sup>13</sup>

A utilização do sistema CMH para testes de paternidade permite excluir a paternidade em 90% dos casos. A sua utilização conjuntamente com o sistema ABO e testes serológicos incrementa o poder de exclusão até aos 95%.<sup>14</sup>

Contudo o sistema CMH continuava a não ser resposta ao problema. Para além de não permitir ter certezas na exclusão, também não possibilitava a inclusão. Atualmente este sistema é utilizado somente em casos pontuais onde o uso do ADN é mais limitado, como em casos de estabelecimento da paternidade onde não é possível

testar o presumível pai, mas somente os avós paternos. Isto porque, como é transmitido em bloco é menos sujeito a mutações.<sup>14</sup>

#### 4.4. ADN *fingerprint*

Em 1985, um geneticista Britânico *Alec Jeffreys*, descobriu como usar o ADN para fins identificativos e para estabelecer relações de paternidade, ao estudar as regiões *fingerprint*. Como anteriormente falado, o ADN encontra-se no núcleo de praticamente todas as células. Dentro das poucas exceções estão os eritrócitos, que se encontram desprovidos de núcleo e logo de ADN.<sup>8,9</sup>

O ADN está organizado em cromossomas, havendo 23 pares de cromossomas na espécie humana. A maior parte do ADN não varia de individuo para individuo, mas existem umas regiões, específicas não codificantes, onde existem múltiplas variações.<sup>8,9</sup>

Dentro das regiões não codificantes podem distinguir-se o ADN satélite, as regiões VNTR microssatélite e as regiões VNTR minissatélite. O ADN satélite consiste em sequências muito grandes de repetições sequenciais de ADN não codificante. O ADN satélite é o principal componente dos centrómeros e é o principal constituinte estrutural de heterocromatina.<sup>8,9</sup>

As primeiras regiões *fingerprint* a serem usadas foram as regiões VNTR microssatélite também chamadas de STR (*Short Tandem Repeats*) ou de SSR (*Simple Sequence Repeat*). Estas zonas são constituídas por repetições que vão das duas às seis bases de nucleótidos, havendo grande variação no número de repetições entre diferentes indivíduos.<sup>8,9</sup>

Outras regiões também passíveis de serem usadas são as regiões VNTR minissatélite. Estas, ao contrário das anteriores resultam da repetição de um maior número de par da bases, entre 5 a 15, podendo ser repetidas várias vezes.<sup>8,9</sup>

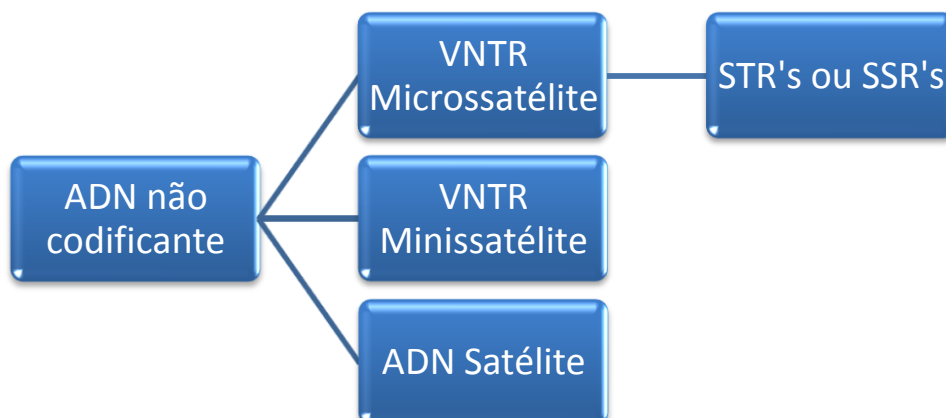


Figura 7 – Diagrama ADN não codificante

#### 4.4.1. Técnica RFLP

Foi uma das primeiras técnicas a surgir. A técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) baseia-se na identificação de sequências de ADN de diferentes tamanhos após a digestão da amostra de ADN por enzimas de restrição. As enzimas de restrição são endonucleases que apresentam especificidade para determinadas zonas do ADN, efetuando um corte na cadeia.<sup>15</sup>

O segmento de ADN criado terá assim diferentes comprimentos conforme os polimorfismos existentes, que pode ser determinado por eletroforese.<sup>15</sup>

Esta técnica foi muito usada no projeto de sequenciação do ADN, em testes de identificação e de paternidade, mas é demasiado lenta, pelo que atualmente é pouco usada.<sup>15</sup>

#### 4.4.2. Técnica PCR

Para que seja possível o uso do ADN para técnicas de identificação e atribuição de paternidade é necessário amplificar em laboratório as regiões *fringerprint* do ADN. Isto é feito através da técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que é um processo rápido para a amplificação enzimática *in vitro* de um segmento específico de ADN.<sup>16</sup>

Na técnica PCR são usados: o segmento de ADN de cadeia dupla a ser amplificado, os *primers* (sequências de iniciação que se vão ligar a uma zona específica do ADN), a *DNApolimerase* e os trifosfatos de desoxirribonucleósidos. Conforme figura:<sup>16</sup>

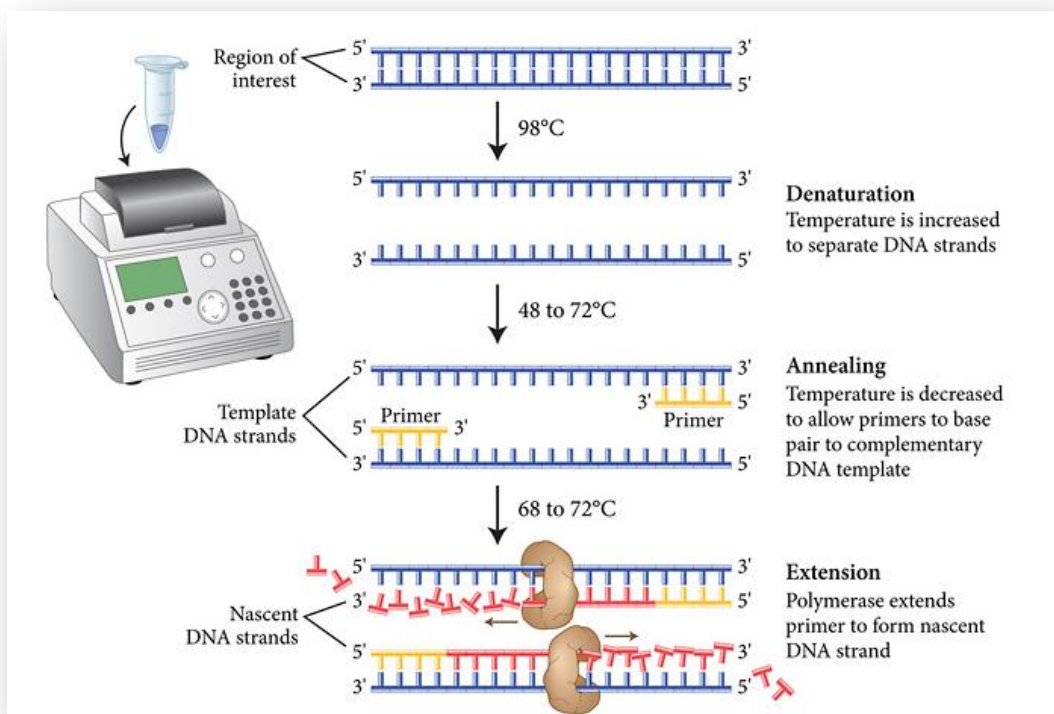


Figura 8- Esquema da PCR.

Os *primers* são adicionados em excesso em comparação com o ADN a ser amplificado. Eles hibridam com ambas as cadeias em regiões pré-estabelecidas e servem iniciadores da replicação da cadeia. Os trifosfatos de desoxirribonucleósidos são introduzidos segundo a ordem da cadeia molde pela *DNApolimerase*.<sup>16</sup>

Após o fim do 1º ciclo, o processo pode voltar a ser repetido e a quantidade de ADN duplica a cada ciclo subsequente, dando origem assim a um ciclo exponencial.<sup>16</sup>

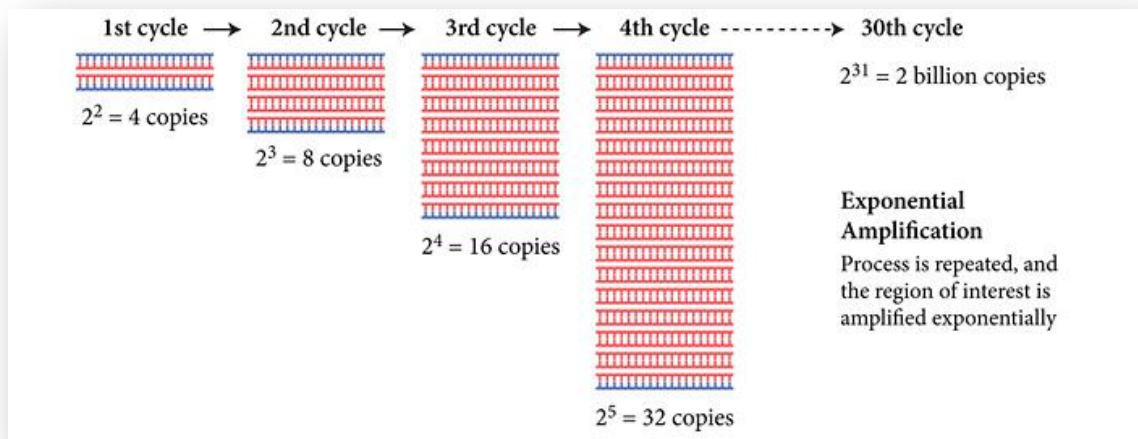


Figura 9 – Número de cópias formadas por cada ciclo da PCR.

Os usos da técnica PCR estão em constante crescimento, a técnica está presente em muitos processos laboratoriais desde a clonagem, estudo de mutagenese, engenharia de ADN, estudo das regiões *fingerprint* para identificação pessoal ou testes de paternidade, estudo de doenças genéticas, etc.<sup>16</sup>

#### Tipos de sondas utilizadas:

- Sondas *Unilocus*: são sondas que hibridam com uma região específica do ADN. Como resultado é observável uma banda em indivíduos homocigóticos e duas bandas nos indivíduos heterocigóticos.<sup>9</sup>
- Sondas *Multilocus*: permitem detetar de uma só vez várias regiões hipervariáveis. Originam um elevado conjunto de bandas que são características de um indivíduo. São muito usadas para fins de identificação.<sup>9</sup>

#### 4.5. Matemática Forense

Em 1908, *Godfrey Harold Hardy*, matemático Britânico propôs um modelo matemático, que permitia calcular o Índice de Paternidade (PI).<sup>17</sup>

O modelo baseia-se na igualdade teórica entre as duas respostas possíveis para a questão da paternidade, onde  $H_1$  o suposto pai era realmente o pai, e  $H_2$  onde tal suposição estaria errada, ou seja, que a probabilidade de  $H_1$  seria equiparável à probabilidade de  $H_2$ , antes da realização de qualquer teste:<sup>17</sup>

$$P|H_1 = P|H_2$$

Através de exames laboratoriais é possível atribuir valores às incógnitas tendo por base os perfis genéticos dos intervenientes, interpretados segundo as regras de hereditariedade e das frequências observadas na população a que pertencem os indivíduos analisados.<sup>17</sup>

Assim a relação de verossemelhança entre ambos dará o Índice de Paternidade (PI):<sup>17</sup>

$$PI = P|H_1 / P|H_2$$

Este modelo estava limitado pela biologia que ainda não encontrara mecanismos para atribuir valores ao  $P|H_1$  e ao  $P|H_2$ , com certeza suficiente para atribuir a paternidade.<sup>17</sup>

##### 4.5.1. Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE)

A Lei do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi formulada independentemente por *Hardy* e por *Wilhelm Weinberg* (médico Alemão), em 1908.<sup>17</sup>

A Lei diz que as frequências alélicas se mantem estáveis, numa população através das várias gerações, independentemente de se tratar ou não de um alelo raro. Este modelo matemático assume uma população ideal, isto é, uma população com ausência de mutações, seleção genética, incorporação de imigrantes, etc.<sup>17</sup>

Num caso simplificado, os alelos  $a$  e  $A$  com as frequências alélicas  $p$  e  $q$ . Distribuídos segundo as Leis de *Mendel*, seria representado por:<sup>17</sup>

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

E a representação gráfica da Lei, seria:

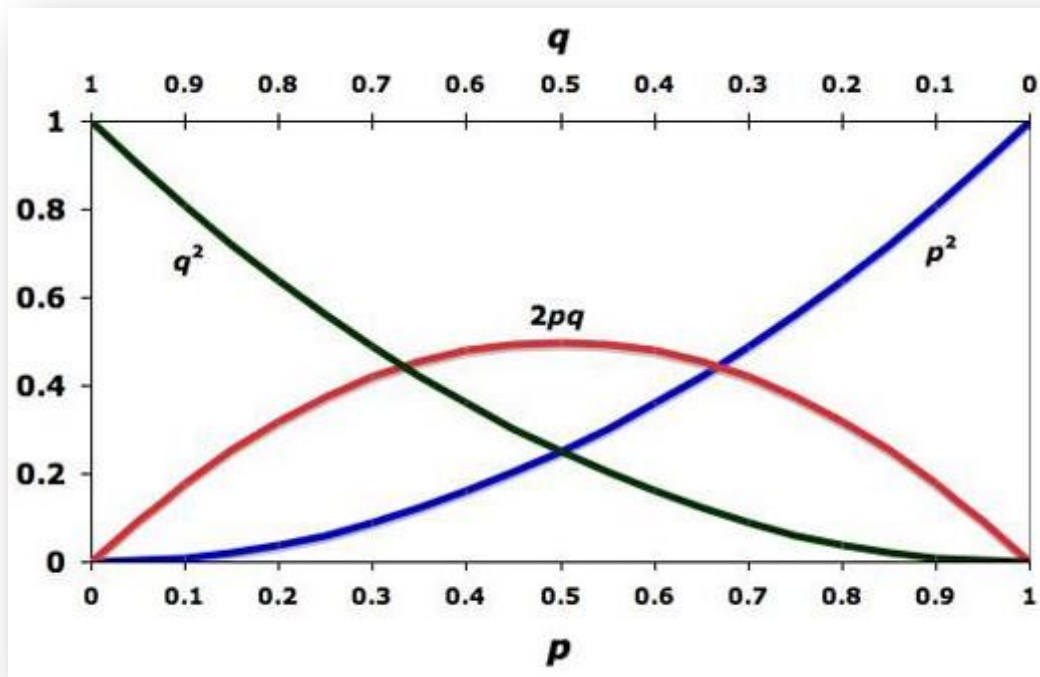


Gráfico 1 – Representação gráfica do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Desvios marcados ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg* podem ser indicadores de endogamia de alelos.<sup>17</sup>

#### 4.5.2. Índice e Probabilidade de Paternidade

O cálculo do Índice de Paternidade (PI) é baseado na análise e comparação das bandas obtidas durante a execução do teste de paternidade. Cada banda tem um peso molecular que é determinado por comparação com um padrão. Assim, tanto nos testes com minissatélites como nos de microssatélites, o comprimento dos alelos obtidos são comparados com os dos progenitores (a mãe e o pretenso pai). Uma das bandas do filho será idêntica a uma das bandas maternas e a outra será proveniente do pai.<sup>17</sup>

A existência de uma banda no pretenso filho, não relacionada com o pai, denota uma provável exclusão de paternidade, que deverá ser sempre confirmada com uma segunda discrepância. Regra da dupla exclusão.<sup>17</sup>

Quando o pai não é excluído, torna-se necessário calcular a sua inclusão. A inclusão é obtida através do cálculo do Índice Cumulativo de Paternidade (CPI). Este resulta da multiplicação de todos os PI obtidos nos diferentes marcadores. Como referido, o PI reflete a razão entre a probabilidade de que um homem com o fenótipo do possível pai, seja de facto o seu pai biológico. E a probabilidade de que um outro homem, ao acaso, possa ser o verdadeiro pai.<sup>17</sup>

A fórmula para o cálculo do PI pode ser explicada como: <sup>17</sup>

$$PI = \frac{X_m \cdot X_p}{Y_m \cdot Y_p}$$

Onde:

- $X_m$  = Probabilidade de transmissão do alelo materno;
- $X_p$  = Probabilidade de transmissão do alelo obrigatório paterno;
- $Y_m$  = Probabilidade de transmissão do alelo materno;
- $Y_p$  = Frequência do alelo paterno na população de mesma raça;

No caso de existência de alelos homozigóticos, a probabilidade dos alelos  $X_m$  e  $Y_m$  será de 1. E no caso de heterozigóticos a probabilidade será de 0,5. Esta fórmula pode, por isso, ser simplificada ao anular a probabilidade de  $m$ , que será sempre igual a 1. E então temos que, o PI, será: <sup>17</sup>

$$PI = \frac{X_p}{Y_p}$$

O valor de PI deve ser calculado para cada alelo analisado. A multiplicação dos valores de PI dar-nos-á o Índice Cumulativo de Paternidade (CPI): <sup>17</sup>

$$CPI = PI_1 \times PI_2 \times \dots \times PI_n$$

Quanto maior o CPI, maior a probabilidade de o investigado ser o pai biológico. O valor do CPI mede a força ou a importância da evidência genética. Ele indica se a evidência preenche melhor a hipótese de ser o homem testado o verdadeiro pai ou a hipótese de outro homem ser o pai. <sup>17</sup>

#### 4.5.3.1 Teorema de Bayes

O teorema de *Bayes* foi elaborado por *Thomas Bayes*, matemático Britânico. Este teorema correlaciona uma probabilidade condicional, com a sua inversa. <sup>17</sup>

Aplicando este teorema aos testes de paternidade, temos que, a probabilidade de paternidade ( $W$ ) ser-nos-á dada pela seguinte equação: <sup>17</sup>

$$W = \frac{PP \cdot CPI}{PP \cdot CPI + (1 - PP)}$$

Onde  $PP$  será a constante de paternidade *a priori*, que será sempre aceite como sendo 50%, uma vez que antes de se realizar qualquer teste de paternidade, um determinado homem terá a mesma probabilidade de ser ou não o verdadeiro pai. <sup>17</sup>

Então simplificando a fórmula, temos que: <sup>17</sup>

$$W = \frac{CPI}{CPI + 1}$$

#### 4.5.3. Fórmulas simplificadas de cálculo de paternidade:

Tendo por base os cálculos anteriores, foram descritas fórmulas simplificadas para o cálculo da paternidade.

a) Quando se usa o trio Pai-Mãe-Filho:

GF	GM	GAP	Numerador	Denominador	IP
<b>A<sub>i</sub>A<sub>i</sub></b>	A <sub>i</sub> A <sub>i</sub>	A <sub>i</sub> A <sub>i</sub>	1	p <sub>i</sub>	1/ p <sub>i</sub>
		A <sub>i</sub> A <sub>j</sub> , j ≠ i	1/2	p <sub>i</sub>	1/2p <sub>i</sub>
		A <sub>j</sub> A <sub>k</sub> , k ≠ i, j	0	p <sub>i</sub>	0
<b>A<sub>i</sub>A<sub>i</sub></b>	A <sub>i</sub> A <sub>j</sub> , i ≠ j	A <sub>i</sub> A <sub>i</sub>	1/2	p <sub>i</sub> /2	1/ p <sub>i</sub>
		A <sub>i</sub> A <sub>j</sub> , j ≠ i	1/4	p <sub>i</sub> /2	1/2 p <sub>i</sub>
		A <sub>j</sub> A <sub>k</sub> , k ≠ i, j	0	p <sub>i</sub> /2	0
<b>A<sub>i</sub>A<sub>j</sub>, i ≠ j</b>	A <sub>i</sub> A <sub>i</sub>	A <sub>j</sub> A <sub>j</sub>	1	p <sub>j</sub>	1/p <sub>j</sub>
		A <sub>j</sub> A <sub>k</sub> , k ≠ j	1/2	p <sub>i</sub>	1/2 p <sub>j</sub>
		A <sub>k</sub> A <sub>l</sub> , k, l ≠ j	0	p <sub>i</sub>	0
<b>A<sub>i</sub>A<sub>j</sub>, i ≠ j</b>	A <sub>i</sub> A <sub>j</sub> , i ≠ j	A <sub>i</sub> A <sub>i</sub>	1/2	(p <sub>i</sub> + p <sub>j</sub> )/2	1/(p <sub>i</sub> + p <sub>j</sub> )
		A <sub>i</sub> A <sub>j</sub>	1/2	(p <sub>i</sub> + p <sub>j</sub> )/2	1/( p <sub>i</sub> + p <sub>j</sub> )
		A <sub>j</sub> A <sub>k</sub> , k ≠ j	1/4	(p <sub>i</sub> + p <sub>j</sub> )/2	1/(2(p <sub>i</sub> + p <sub>j</sub> ))
		A <sub>k</sub> A <sub>l</sub> , k, l ≠ i, j	0	(p <sub>i</sub> + p <sub>j</sub> )/2	0
<b>A<sub>i</sub>A<sub>j</sub>, i ≠ j</b>	A <sub>i</sub> A <sub>k</sub> , k ≠ i, j	A <sub>j</sub> A <sub>j</sub>	1/2	p <sub>j</sub> /2	1/ p <sub>j</sub>
		A <sub>j</sub> A <sub>i</sub> , i ≠ j	1/4	p <sub>j</sub> /2	1/2 p <sub>j</sub>
		A <sub>k</sub> A <sub>l</sub> , k, l ≠ j	0	p <sub>j</sub> /2	0

**Tabela 3** – Tabela simplificada para o cálculo da Paternidade, onde GF - Genoma do Filho, GM - Genoma Mãe, GAP - Genoma do Alegado Pai e P<sub>i</sub> - Frequência do alelo.

b) Quando se usa a dupla Pai-Filho:

GF	GAP	Numerador	Denominador	IP
<b>A<sub>i</sub>A<sub>i</sub></b>	A <sub>i</sub> A <sub>i</sub>	p <sub>i</sub> <sup>3</sup>	p <sub>i</sub> <sup>4</sup>	1/ p <sub>i</sub>
	A <sub>i</sub> A <sub>j</sub> , j ≠ i	p <sub>i</sub> <sup>2</sup> P <sub>j</sub>	2p <sub>i</sub> <sup>3</sup> P <sub>j</sub>	1/2p <sub>i</sub>
<b>A<sub>i</sub>A<sub>j</sub>, i ≠ j</b>	A <sub>i</sub> A <sub>i</sub>	P <sub>i</sub> <sup>2</sup> P <sub>j</sub>	2p <sub>i</sub> <sup>3</sup> P <sub>j</sub>	1/2p <sub>i</sub>
	A <sub>i</sub> A <sub>j</sub> , j ≠ i	P <sub>i</sub> P <sub>j</sub> (P <sub>i</sub> +P <sub>j</sub> )	(2p <sub>i</sub> p <sub>j</sub> ) <sup>2</sup>	(P <sub>i</sub> +P <sub>j</sub> )/(4p <sub>i</sub> p <sub>j</sub> )
	A <sub>i</sub> A <sub>k</sub> , k ≠ j	P <sub>i</sub> P <sub>i</sub> P <sub>k</sub>	4P <sub>i</sub> <sup>2</sup> P <sub>i</sub> P <sub>k</sub>	1/4p <sub>i</sub>

**Tabela 4** – Tabela simplificada para o cálculo da Paternidade, onde GF - Genoma do Filho, GAP - Genoma do Alegado Pai e P<sub>i</sub> - Frequência do alelo.

#### 4.5.4. Índice Avuncular (AI)

O índice avuncular mostra a probabilidade de paternidade entre parentes próximos. O AI é calculado segundo a seguinte fórmula:<sup>17</sup>

$$AI = \frac{H1}{H2} = \frac{0,5X + 0,5Y}{Y} = \frac{PI + 1}{2}$$

Onde:

- H<sub>1</sub> será a probabilidade do irmão do homem testado ser o real pai biológico. À partida este valor corresponderá ao somatório de 50% de X (probabilidade de transmissão do alelo obrigatório paterno) e 50% de Y (alelo proveniente de um homem retirado ao acaso na população da mesma raça);
- H<sub>2</sub> será a probabilidade de um homem ao acaso ser o verdadeiro pai biológico, que será igual à frequência do alelo na população da mesma raça (Y).

O AI pode ser determinado para cada um dos alelos estudados. A multiplicação dos AI dar-nos-á o Índice Cumulativo Avuncular (CAI):<sup>17</sup>

$$CAI = AI_1 \times AI_2 \times \dots \times AI_n$$

A razão do CPI pelo CAI indicar-nos-á quão mais provável é a relação de paternidade entre um indivíduo e seu irmão relativamente ao filho em estudo.<sup>17</sup>

#### 4.5.5. Poder de Discriminação

O poder de discriminação (PD) é a probabilidade que dois indivíduos da mesma população tenham um diferente genótipo para um marcador. Ele é calculável através da fórmula:<sup>17</sup>

$$PD = 1 - 2 \cdot (\sum_{i=1}^n P_i^2)^2 - \sum_{i=1}^n P_i^4$$

Onde  $P_i$  será a frequência desse alelo na população,  $n$  o número de pessoas analisadas para esse marcador, e  $i$  tomará todos os valores desde 1 até  $n$ .<sup>17</sup>

Para alelos que só possuem uma cópia por célula, a fórmula será:<sup>17</sup>

$$PD = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

O Poder de Discriminação Cumulativo (CPD) será o resultado da multiplicação de todos os PD.<sup>17</sup>

#### 4.5.6. Poder de exclusão

O Poder de Exclusão (PE) é calculável a partir da seguinte relação: <sup>18</sup>

$$PE = 1 - RMNE$$

Onde RMNE representa a probabilidade de Homem Aleatório Não ser Excluído, que está relacionado com a proporção de determinado alelo obrigatório na população de referência (alelo j). Então  $RMNE_j$  será: <sup>18</sup>

$$RMNE_j = 1 - (1 - P_{ji})^2$$

Onde  $P_{ji}$  representa a distribuição do alelo obrigatório paterno na população. <sup>18</sup>

Caso não seja possível atribuir o alelo paterno obrigatório, ao pai, então a fórmula será: <sup>18</sup>

$$RMNE_j = 1 - (1 - P_{ji} - P_{jk})^2$$

Onde  $P_{ji}$  e  $P_{jk}$  representam a distribuição de ambos os alelos na população. <sup>18</sup>

O RMNE será o resultado da multiplicação dos RMNE de cada alelo calculado: <sup>18</sup>

$$RMNE = RMNE_1 \times RMNE_2 \times \dots \times RMNE_n$$

#### 4.5.7. A importância das Mutações aplicadas aos testes de paternidade

Como referido anteriormente, é possível a existência de mutações que alterem o património genético. Algumas dessas mutações podem ocorrer nos gâmetas, dando origem a descendência cujo património genético não é inteiramente idêntico ao dos progenitores. Por esta razão, as mutações podem ter implicações nos resultados dos testes de paternidade e assim uma não conformidade não é suficiente para a exclusão de paternidade. <sup>17</sup>

##### A regra das duas exclusões:

Uma não concordância entre os alelos estudados no filho e do pai, não é suficiente para excluir a paternidade, devido à possível ocorrência de mutações. Normalmente as mutações ocorrem sempre um degrau para cima ou para baixo, sendo acrescentadas ou eliminadas pares de bases, ou sequência repetitiva completa. A probabilidade de ocorrência de mutações diminui com o aumento do número de bases mutadas. <sup>17</sup>

Por regra, as mutações que originam a adição ou deleção de uma sequência repetitiva, ocorrem com uma probabilidade dez vezes superior relativamente às que envolvem adição ou deleção de duas sequências repetitivas. Por sua vez, as repetições que envolvem a adição ou deleção de duas sequências repetitivas ocorrem

com uma frequência dez vezes superior face às que envolvem a adição ou deleção de três sequências repetitivas. <sup>17</sup>

A determinação de duas mutações por tradição leva à exclusão da paternidade, embora estejam descritos casos raros de três mutações. <sup>17</sup>

Introdução de mutações no cálculo do PI:

As mutações que eventualmente apareçam são valorizadas estatisticamente, sendo calculado o seu PI. O cálculo é efetuado segundo a equação: <sup>17</sup>

$$PI = \frac{\mu}{\hat{A}}$$

Sendo  $\mu$  a taxa de mutação do *locus* e  $\hat{A}$  a média do poder de exclusão do *locus*. O valor deste PI será muito menor de um, mas superior a zero, por essa razão este PI diminuirá o CPI. <sup>17</sup>

**4.6. Valores usados pelos laboratórios para atribuição da paternidade**

**4.6.1. Tabela de Hummel (1971, desatualizada)**

Probabilidade (W)	Probabilidade de Paternidade
99,90% - 99,80%	Paternidade Praticamente Provada
99,79% - 99,10%	Paternidade Extremamente Provável
99,09% - 95,00%	Paternidade Muito Provável
94,99% - 90,00%	Paternidade Provável
89,99% - 80,00%	Resultado indeciso
<80%	Teste de paternidade sem valor

Tabela 5 – Tabela de Hummel.

**4.6.2. Tabela de Hummel modificada**

Probabilidade (W)	Probabilidade de Paternidade
>99,73%	Paternidade Praticamente Provada
99% - 99,73%	Paternidade Extremamente Provável

Tabela 6 – Tabela de Hummel modificada.

### 4.6.3. Tabela constante no manual Qiagen® N.V.

Probabilidade (W)	Probabilidade de Paternidade
>99,73%	Paternidade Praticamente Provada
>99-99,73%	Paternidade Altamente Provável
>95-99%	Paternidade Muito Provável
>90-95%	Paternidade Provável
>80-90%	Indicação Certa de Paternidade Biológica
>70-80%	Indicação Formal de Paternidade Biológica
>30-70%	Não preditivo
>20-30%	Indicação Formal de não Paternidade
>10-20%	Indicação Certa de não Paternidade
>5-10%	Paternidade Não Provável
>1-5%	Paternidade Muito Improvável
0.27-1%	Paternidade Altamente Improvável
<0,27%	Paternidade Praticamente Excluída

**Tabela 7** – Valores usados para a atribuição da paternidade.

## 5. PROVA EM TRIBUNAL

No último século assistiu-se a uma evolução muito grande por parte da civilização ocidental, fruto do rápido desenvolvimento da ciência. No caso português, a situação não foi diferente. No que respeita à paternidade, esta deixou de ser um exclusivo dos progenitores, tendo o homem perdido o poder de decisão.

Na sociedade atual o interesse da criança prevalece sobre o dos seus progenitores, tendo o filho direito à ajuda dos seus progenitores, quer a nível material como afetivo, destinado ao seu próprio desenvolvimento.

Por esta razão, a determinação do vínculo biológico ganhou uma relevância acrescida, quer ao nível jurídico, quer ao nível sociológico.

Os testes de paternidade são usados em direito civil para estabelecer a paternidade, e em direito penal quando estiverem em causa crimes.

### 5.1. Prova no Processo Civil

O CCP estabelece que “*as provas têm por função a demonstração da realidade dos factos*” (art.º 341 CCP). Esclarecendo no ponto seguinte que cabe àquele que invocar direito fazer prova dos factos.<sup>19</sup>

Assim, toda a investigação é consequência da alegação prévia dos factos, onde se procurará demonstrar a veracidade desses mesmos factos. A demonstração de tal realidade terá sempre um carácter subjetivo, onde ambas as partes tentarão convencer o tribunal da segurança dos seus argumentos e desta forma obter uma resposta favorável.<sup>19</sup>

No caso da paternidade e de acordo com o CCP, no seu artigo 1864º;<sup>19</sup>

*“Sempre que seja lavrado registo de nascimento de menor apenas com a maternidade estabelecida, deve o funcionário remeter ao tribunal certidão integral do registo, a fim de se averiguar officiosamente a identidade do pai.”*

Este artigo resultou da reforma do código civil Português (CCP), protagonizada pelo Decreto-Lei 496/1977, de 25 de novembro. Este Decreto-Lei passou a obrigar à menção do respetivo pai, aquando do registo do nascimento. Sendo a partir desta data que o volume de testes de paternidade registou um aumento significativo.

Deste artigo resulta a impossibilidade de existir filhos de pais anónimos. O artigo seguinte, o artigo 1865º, refere o procedimento da averiguação officiosa:<sup>19</sup>

- “1. Sempre que possível, o tribunal ouvirá a mãe acerca da paternidade que atribui ao filho.*
- 2. Se a mãe indicar quem é o pai ou por outro meio chegar ao conhecimento do tribunal a identidade do pretense progenitor, será este também ouvido.”*

*“3. No caso de o pretense progenitor confirmar a paternidade, será lavrado termo de perfilhação e remetida certidão para averbamento à repartição competente para o registo.*

*4. Se o presumido pai negar ou se recusar a confirmar a paternidade, o tribunal procederá às diligências necessárias para averiguar a viabilidade da ação de investigação de paternidade.*

*5. Se o tribunal concluir pela existência de provas seguras da paternidade, ordenará a remessa do processo ao agente do Ministério Público junto do tribunal competente, a fim de ser intentada a ação de investigação.”*

### **5.1.1. Prova do vínculo biológico**

Quando o CCP foi redigido, na Reforma do Código Civil de 1977, a ciência não dispunha ainda dos meios atuais para a determinação da paternidade. Como referido anteriormente neste trabalho, as relações de paternidade eram estabelecidas por via do estudo de antígenos de histocompatibilidade (sistema HLA), tendo margens de certeza de 90% a 95%. Ora, este sistema não gerava margens de segurança necessárias para atribuir por si só a paternidade, e muitas das vezes não a conseguia excluir. Assim, o recurso às presunções legais seria o método mais fiável para reconhecer juridicamente a paternidade.<sup>14,19</sup>

As presunções de paternidade indicam a probabilidade de uma relação de paternidade entre o filho e o suposto pai, mencionando a força dessa probabilidade.<sup>19</sup>

A prova do vínculo biológico é baseada em factos instrumentais, havendo os que corroboram a paternidade (positivos), como por exemplo, a existência à data da conceção de relações sexuais entre os progenitores, e os que não corroboram (negativos), existência à data de mais de um parceiro sexual. A estes dados somam-se os dados obtidos por prova científica, resultando daqui a certeza ou não da paternidade.<sup>19</sup>

Atualmente, esta situação alterou-se, pois com o recurso às regiões *fingerprint* do ADN, o intervalo de certeza é muito elevado, sendo possível obter resultados com intervalos superiores a 99,995%.<sup>27</sup>

Entendeu-se, então, que somente no caso da impossibilidade de recorrer à prova científica, se determinará a paternidade com recurso exclusivo à presunção da mesma, uma vez que a fiabilidade é muito menor.<sup>19</sup>

Por esta razão, o CCP deve ser enquadrado historicamente tendo em consideração a evolução das ciências biológicas.<sup>19</sup>

### **5.1.2. Presunção da paternidade**

Nos termos do CCP a paternidade será presumida, se (art.º 1871º):<sup>19</sup>

*“1. A paternidade presume-se:*

*a. Quando o filho houver sido reputado e tratado como tal pelo pretense pai e reputado como filho também pelo público;”*

- “b. Quando exista carta ou outro escrito no qual o pretenso pai declare inequivocamente a sua paternidade;*
- c. Quando, durante o período legal da concepção, tenha existido comunhão duradoura de vida em condições análogas às dos cônjuges ou concubinato duradouro entre a mãe e o pretenso pai;*
- d. Quando o pretenso pai tenha seduzido a mãe, no período legal da concepção, se esta era virgem e menor no momento em que foi seduzida, ou se o consentimento dela foi obtido por meio de promessa de casamento, abuso de confiança ou abuso de autoridade.*
- e. Quando se prove que o pretenso pai teve relações sexuais com a mãe durante o período legal de concepção.”*

O mesmo artigo refere também na alínea 2, que tal presunção considera-se refutada quando existem sérias dúvidas sobre a paternidade.<sup>19</sup>

*“A presunção considera-se ilidida quando existam dúvidas sérias sobre a paternidade do investigado.”*

### **5.1.3. O ónus da Prova**

O ónus da prova está regulado pelo artigo 342º do CCP, que refere que:<sup>19</sup>

- 1 - Àquele que invocar um direito cabe fazer a prova dos factos constitutivos do direito alegado.*
- 2 - A prova dos factos impeditivos, modificativos ou extintivos do direito invocado compete àquele contra quem a invocação é feita.*
- 3 - Em caso de dúvida, os factos devem ser considerados como constitutivos do direito.*

Ou seja, em direito quem alega determinado facto, tem o ónus da prova, tendo por isso, a obrigação de provar os factos. No caso das ações de investigação da paternidade, o ónus cabe ao autor da ação, isto é, ao filho ou à mãe em sua representação, ainda que menor (artº 1870 do CCP).<sup>19</sup>

### **5.1.4. O Princípio da Cooperação**

O Princípio da Cooperação consta no Código Processo Civil (CPC), no artigo 7º, número 1 e no artigo 417º números 1 e 2.<sup>20</sup>

O artigo 7º refere:<sup>20</sup>

- “1 - Na condução e intervenção no processo, devem os magistrados, os mandatários judiciais e as próprias partes cooperar entre si, concorrendo para se obter, com brevidade e eficácia, a justa composição do litígio. (...)”*

O artigo 417º refere: <sup>20</sup>

*“1 - Todas as pessoas, sejam ou não partes na causa, têm o dever de prestar a sua colaboração para a descoberta da verdade, respondendo ao que lhes for perguntado, submetendo-se às inspeções necessárias, facultando o que for requisitado e praticando os atos que forem determinados.*

*2 - Aqueles que recusem a colaboração devida serão condenados em multa, sem prejuízo dos meios coercitivos que forem possíveis; se o recusante for parte, o tribunal apreciará livremente o valor da recusa para efeitos probatórios, sem prejuízo da inversão do ónus da prova decorrente do preceituado no n.º 2 do artigo 344.º do Código Civil. (...).”*

Ou seja, segundo estes artigos todos os cidadãos estão obrigados ao Princípio da Cooperação com a Justiça, sendo que, existem sanções para quem não cooperar. No caso específico dos testes de ADN, a recusa do réu em participar no mesmo é uma flagrante violação a tal princípio. <sup>20</sup>

O artigo 417º deixa também em aberto a possibilidade do tribunal recorrer a meios coercivos para obtenção de prova, bem como à apreciação de tal negação, como obstrução à justiça e desta forma a inverter o ónus da prova ou optar pela presunção de paternidade do suspeito. <sup>20</sup>

#### **5.1.5. Inversão do ónus da prova**

O ónus da prova pode ser invertido se a parte contrária tiver tornado impossível a prova. Esta inversão está regulamentada pelo artigo 344º, do CCP, número 2, que refere: <sup>19</sup>

*“Há também inversão do ónus da prova, quando a parte contrária tiver culposamente tornado impossível a prova ao onerado, sem prejuízo das sanções que a Lei de processo mande especialmente aplicar à desobediência ou às falsas declarações.”*

#### **5.1.6. Contraprova**

A contraprova é uma prova em contrário, ela é um direito que assiste à parte contrária de quem recai o ónus provatório, segundo o artigo 346º do CCP. <sup>19</sup>

*(...) “à prova que for produzida pela parte sobre quem recai o ónus probatório pode a parte contrária opor contraprova a respeito dos mesmos factos, destinada a torná-los duvidosos; se o conseguir, é a questão decidida contra a parte onerada com a prova.”*

Segundo o CCP, artigo 347º, a prova legal só pode ser contrariada por meio de prova oposta (contraprova) que demonstre que a prova não corresponde à verdade. <sup>19</sup>

*“A prova legal plena só pode ser contrariada por meio de prova que mostre não ser verdadeiro o facto que dela for objeto, sem prejuízo de outras restrições especialmente determinadas na Lei.”*

### **5.1.7. Prazo para averiguação da paternidade ou maternidade:**

O volume de pedidos de estabelecimento de paternidade ou maternidade, têm aumentado nos últimos anos e para este facto contribuíram as alterações legislativas efetuadas pelo poder político, como a alteração do artigo 1817º alínea 1, que prolongou para 10 anos o período em que pode ter intentada uma ação de investigação de maternidade, contra os 2 anos anteriormente previstos.

*“1 - A acção de investigação de maternidade só pode ser proposta durante a menoridade do investigante ou nos dez anos posteriores à sua maioridade ou emancipação.”*

Mas também pelo prolongamento dos prazos para contestação, por parte dos pais com um aumento de 2 para 3 anos e sobretudo por parte do filho, que passou dos 2 anos após a maioridade, para os 10 anos. Conforme artigo 1842º:

*1 - A ação de impugnação de paternidade pode ser intentada:*

*a) Pelo marido, no prazo de três anos contados desde que teve conhecimento de circunstâncias de que possa concluir-se a sua não paternidade;*

*b) Pela mãe, dentro dos três anos posteriores ao nascimento;*

*c) Pelo filho, até 10 anos depois de haver atingido a maioridade ou de ter sido emancipado, ou posteriormente, dentro de três anos a contar da data em que teve conhecimento de circunstâncias de que possa concluir-se não ser filho do marido da mãe.*

## **5.2. Prova no Processo Penal**

O Código Penal Português foi aprovado pelo Decreto-Lei 400/82, de 23 de setembro, e revisto pelo Decreto-Lei 48/95, de 15 de março, sujeito a múltiplas atualizações até à versão de atual aprovada pelo Decreto-Lei 60/2013, de 23 de agosto.<sup>21</sup>

O Direito Penal é um braço do direito aplicado à repressão de delitos, com a finalidade de preservar a sociedade e proporcionar o seu desenvolvimento.<sup>21</sup>

Segundo o número 1 do artigo 124.º do Código de Processo Penal, constituem objeto de prova:<sup>22</sup>

*(...) “todos os factos juridicamente relevantes para a existência ou inexistência do crime, a punibilidade ou não punibilidade do arguido e a determinação da pena ou da medida de segurança aplicáveis.”*

As provas são apreciadas segundo a livre convicção por entidade competente, (art.º 127º), sendo admissíveis todas as provas desde que não proibidas por Lei (art.º 125º).<sup>22</sup>

### **5.2.1. Produção de Prova**

Segundo artigo 340º, do Código Processo Penal, a prova é produzida:<sup>22</sup>

*“1 - O tribunal ordena, oficiosamente ou a requerimento, a produção de todos os meios de prova cujo conhecimento se lhe afigure necessário à descoberta da verdade e à boa decisão da causa.*

*2 - Se o tribunal considerar necessária a produção de meios de prova não constantes da acusação, da pronúncia ou da contestação, dá disso conhecimento, com a antecedência possível, aos sujeitos processuais e fá-lo constar da ata (...)*

*4 - Os requerimentos de prova são ainda indeferidos se for notório que:*

*a) As provas requeridas já podiam ter sido juntas ou arroladas com a acusação ou a contestação, exceto se o tribunal entender que são indispensáveis à descoberta da verdade e boa decisão da causa;*

*b) As provas requeridas são irrelevantes ou supérfluas;*

*c) O meio de prova é inadequado, de obtenção impossível ou muito duvidosa;” (...)*

Segundo o Código do Processo Penal cabe então ao tribunal efetuar as diligências necessárias para encontrar a verdade dos factos. O tribunal pode anular a prova que entenda ser de origem duvidosa.

Artigo 341º: <sup>22</sup>

*“A produção da prova deve respeitar a ordem seguinte:*

*a) Declarações do arguido;*

*b) Apresentação dos meios de prova indicados pelo Ministério Público, pelo assistente e pelo lesado;*

*c) Apresentação dos meios de prova indicados pelo arguido e pelo responsável civil.”*

As averiguações de paternidade são englobadas no direito penal, quando resultam de crimes, tais como, coação sexual (artigo 163º), violação (artigo 164º), abuso sexual de pessoa incapaz de resistência (artigo 165º), abuso sexual de pessoa internada (artigo 166º).<sup>22</sup>

### **5.2.2. Princípio da Contraditoriedade**

Deriva do artigo 327º do Código Processo Penal e confere a oportunidade do arguido de contrapor, de se defender.<sup>22</sup>

*1- As questões incidentais sobrevindas no decurso da audiência são decididas pelo tribunal, ouvidos os sujeitos processuais que nelas forem interessados.*

*2- Os meios de prova apresentados no decurso da audiência são submetidos ao princípio do contraditório, mesmo que tenham sido oficiosamente produzidos pelo tribunal.*

### 5.3. Cadeia de Custódia

No contexto legal, a cadeia de custódia representa toda a documentação cronológica evidenciando a apreensão ou recolha do indício, o seu transporte e armazenamento, o processamento e a obtenção e análise dos resultados.<sup>23</sup>

Para assegurar a garantia da cadeia de custódia torna-se necessário documentar cada passo que o indício deu, desde a sua recolha até à apresentação em tribunal dos resultados. Isto é feito recorrendo a um código que é atribuído a cada indício, sendo depois registado num sistema informático ou físico.<sup>23</sup>

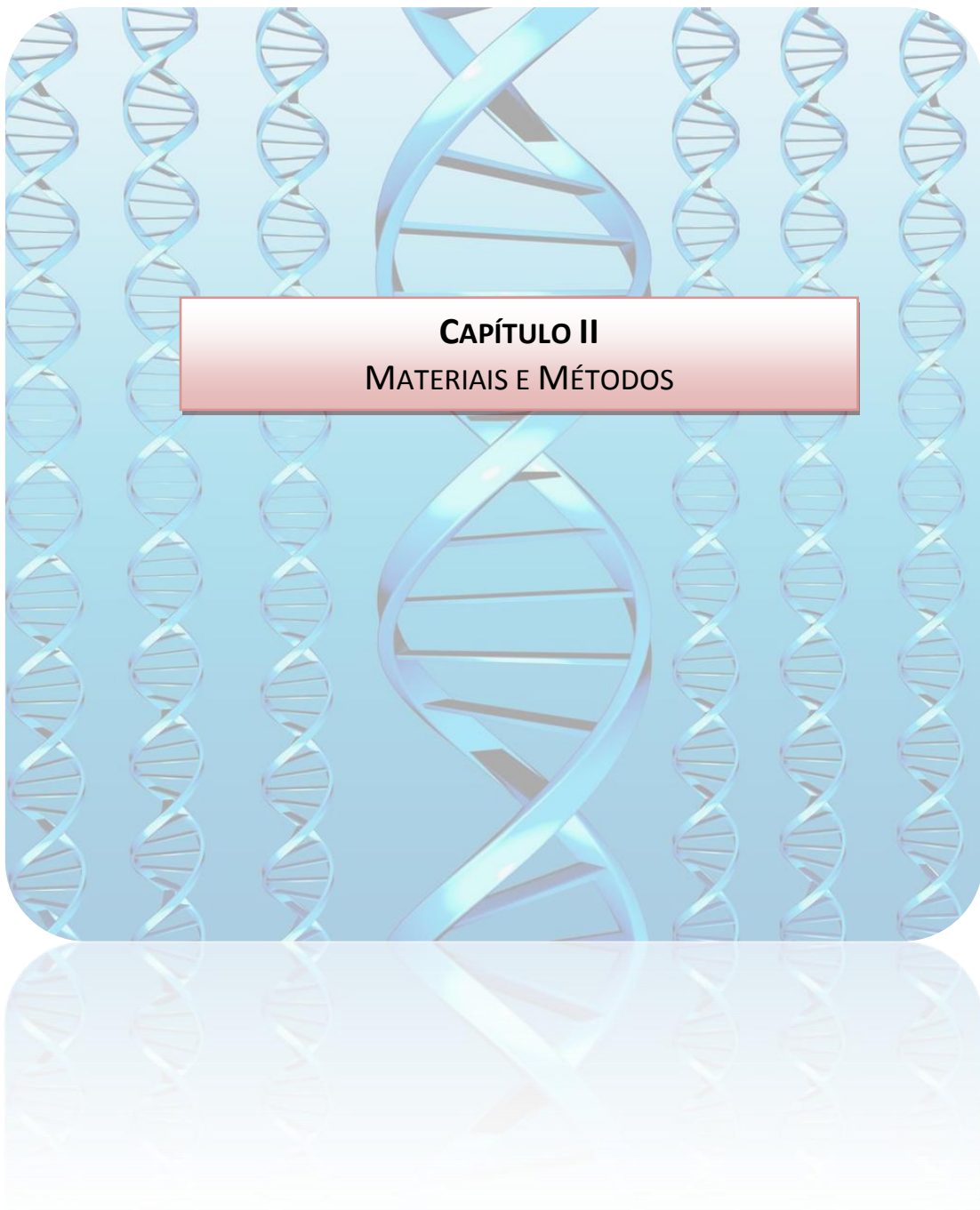
De seguida todos os passos dados pelo indício são registados no sistema, recorrendo ao seu código. Deve ainda ser anotado, o que foi recolhido, quando foi recolhido, onde foi recolhido e em que condições foi recolhido. Em cada uma das etapas o responsável pela manipulação do indício deve ser identificado.<sup>23</sup>

Assim a documentação cronológica da prova incluirá:<sup>24</sup>

- A etiquetagem;
- O registo das circunstâncias em que a recolha decorreu;
- A custódia inicial;
- Mudanças de custódia.

A cadeia de custódia é um conceito-chave de todas as investigações criminais porque sem esta, é impossível em tribunal garantir se determinada prova recolhida ou obtida pertence de facto ao réu ou a outro cidadão. E sem este vínculo é impossível a condenação do arguido.<sup>23</sup>





**CAPÍTULO II**  
**MATERIAIS E MÉTODOS**



## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

O propósito deste trabalho consiste na identificação dos marcadores usados pelos diferentes laboratórios, nos intervenientes submetidos e determinar que amostras são usadas para a elaboração dos testes de paternidade.

Assim, neste trabalho, os laboratórios foram divididos em:

- Laboratórios de referência, segundo a Lei 45/2004, de 19 de agosto.
- Outros laboratórios.

Como laboratórios de referência foram consultados os INMLCF, IP de Lisboa, Porto e Coimbra, uma vez que estes detêm o exclusivo destas perícias médico-legais, segundo a Lei 45/2004, de 19 de agosto.

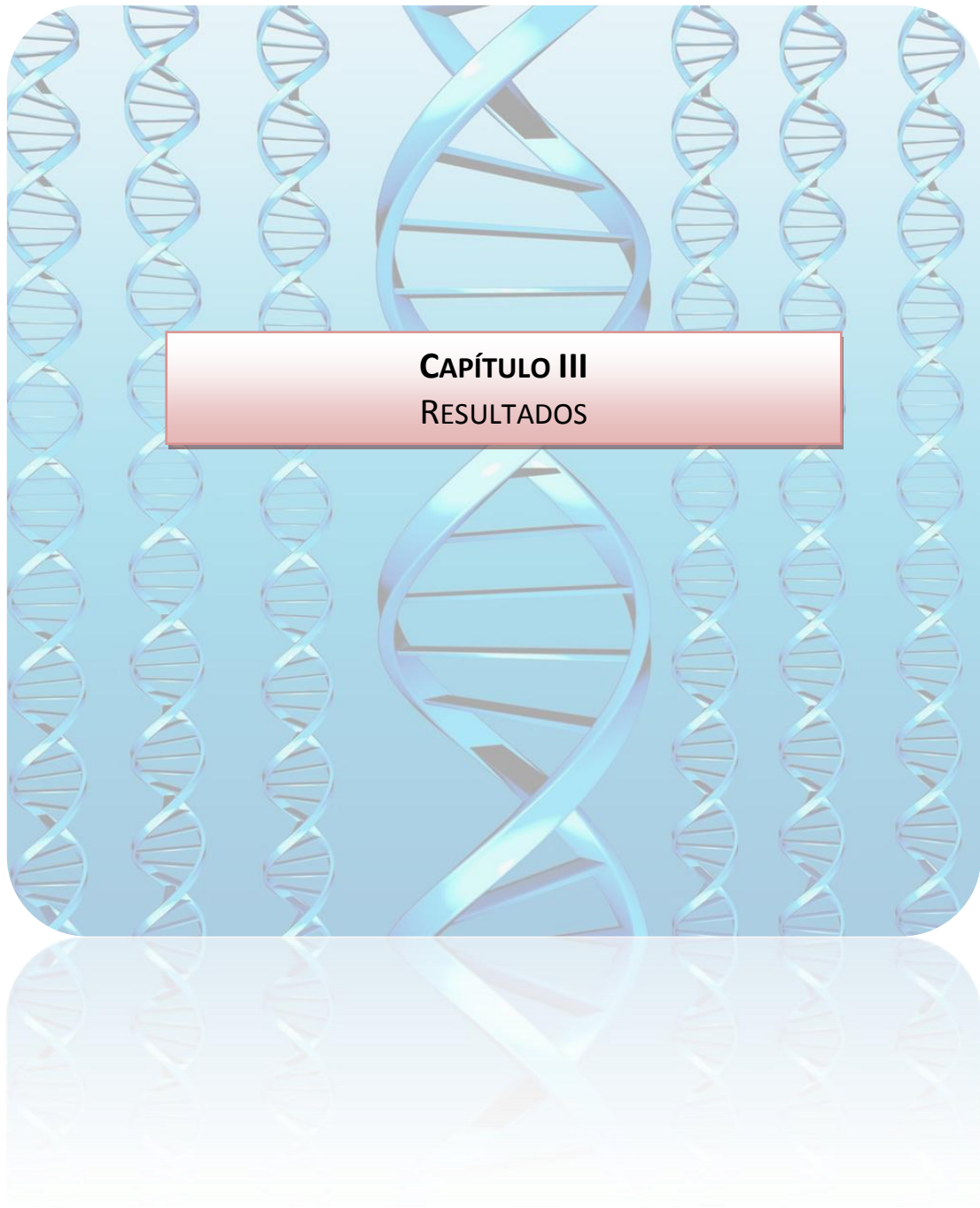
Como outros laboratórios, foram consultados o IPATIMUP e os laboratórios privados da região Porto, sendo estes o *Labmed*<sup>®</sup>, o centro de Genética Clínica e Diagnóstico Pré-Natal Prof. Sérgio Castedo, o *Endoclub*<sup>®</sup>, o *CGC Genetics*<sup>®</sup> e o *DNA Medical*<sup>®</sup>.

A todos estes laboratórios foram efetuadas as seguintes questões, por via telefónica:

- Que marcadores usam na elaboração do teste de paternidade?
- Se fazem análise ao sangue, saliva, ou ambos?
- Se usam o trio pai-mãe e filho ou a dupla pai-filho?
- Se o laboratório participa em estudos de concordância de resultados com entidades independentes?

No caso específico do laboratório *Endoclub*<sup>®</sup> foi exigido que as estas perguntas fossem transmitidas por correio-eletrónico, através do correio-eletrónico institucional do ICBAS, pelo orientador de mestrado, o que foi efetuado.





**CAPÍTULO III**  
**RESULTADOS**



## 7. RESULTADOS

### 7.1. Das consultas aos laboratórios de referência, segundo Lei 45/2004, 19 de agosto

	Que marcadores usam na elaboração do teste de paternidade	Que amostra usam?	Usam o trio pai-mãe e filho ou a dupla pai-filho?	Se o laboratório participa em estudos de concordância de resultados?
INMLCF, IP (Porto)	<i>Identifiler Direct</i> <sup>®</sup> <i>PowerPlex 16</i> <sup>®</sup>	Sangue e Saliva, submetido cada amostra a um dos testes	Fazem o trio. Se a maternidade for desconhecida fazem com a dupla Pai-Filho.	Sim, <i>International Society for Forensic Genetics</i> – Grupo de trabalho Luso-Espanhol, (GEP-ISFG).
INMLCF, IP (Coimbra)	<i>Identifiler Direct</i> <sup>®</sup> <i>PowerPlex 16</i> <sup>®</sup>	Sangue e Saliva, submetido cada amostra a um dos testes	Fazem o trio. Se a maternidade for desconhecida fazem com a dupla Pai-Filho.	Sim, GEP- ISFG.
INMLCF, IP (Lisboa)	<i>Identifiler Plus</i> <sup>®</sup> <i>PowerPlex 16HS</i> <sup>®</sup>	Sangue e Saliva, submetido cada amostra a um dos testes	Fazem o trio. Se a maternidade for desconhecida fazem com a dupla Pai-Filho.	Sim, GEP-ISFG.

Tabela 8 – Resultado das consultas aos laboratórios.

## 7.2. Das consultas aos outros laboratórios

Laboratórios Públicos:	Que marcadores usam na elaboração do teste de paternidade	Que amostra usam?	Usam o trio pai-mãe e filho ou a dupla pai-filho?	Se o laboratórios participa em estudos de concordância de resultados?
<b>IPATIMUP</b>	<i>PowerPlex 16</i> <sup>®</sup> <i>Essplex Plus</i> <sup>®</sup>	Só sangue, submetido aos dois testes	Fazem o trio. Se a maternidade for desconhecida fazem com a dupla Pai-Filho	Sim, Colégio Americano de Patologia
<b>Labmed</b> <sup>®</sup>	Mandam fazer externamente ao IPATIMUP			
<b>Genética Clínica e Diagnóstico Pré-Natal Prof. Sérgio Castedo</b>	O laboratório não forneceu qualquer dado até à conclusão deste estudo			
<b>Endoclab</b> <sup>®</sup>	O laboratório não forneceu qualquer dado até à conclusão deste estudo			
<b>CGC Genetics</b> <sup>®</sup>	<i>Identifiler Plus</i> <sup>®</sup>	Somente Saliva	Fazem ambos dependendo da vontade de quem procura os serviços	Sim, GEP-ISFG.
<b>DNA Medical</b> <sup>®</sup> – <b>Teste UnoDNA</b> <sup>®*</sup>	<i>PowerPlex 16</i> <sup>®</sup>	Somente Saliva, recolhida em casa pelo próprio e enviado por correio	O teste <i>standard</i> enviado para casa, só inclui a dupla Pai-Filho	Sim, GEP- ISFG.

**Tabela 9** – Resultado das consultas aos laboratórios.

\* O laboratório *DNA Medical*<sup>®</sup> remeteu as respostas às questões para a informação disponibilizada na sua página de internet.

### 7.3. Marcadores Usados pelos testes *PowerPlex 16<sup>®</sup> System* e *PowerPlex 16 HS<sup>®</sup> System* <sup>25, 26</sup>

<i>Locus STR</i>	Corante	Localização no cromossoma	Sequência de repetição 5' ->3'
<b>Amelogenina</b>	TMR	Xp22.1–22.3 e Yp11,2	Não Aplicável
<b>CSF1PO</b>	JOE	5q33.3–34	AGAT
<b>FGA</b>	TMR	4q28	Complexo TTTC
<b>Penta D</b>	JOE	21q	AAAGA
<b>Penta E</b>	FL	15q	AAAGA
<b>TH01</b>	FL	11p15.5	AATG
<b>TPOX</b>	TMR	2p24–2pter	AATG
<b>vWA</b>	TMR	12p13.31	Complexo TCTA
<b>D3S1358</b>	FL	3p	Complexo TCTA
<b>D5S818</b>	JOE	5q23.3–32	AGAT
<b>D7S820</b>	JOE	7q11.21–22	GATA
<b>D8S1179</b>	TMR	8q24.13	Complexo TCTA
<b>D13S317</b>	JOE	13q22–q31	TATC
<b>D16S539</b>	JOE	16q24.1	GATA
<b>D18S51</b>	FL	18q21.3	AGAA
<b>D21S11</b>	FL	21q11–21q21	Complexo TCTA

Tabela 10 – Marcadores usados pelos testes *Promega<sup>®</sup>*.

**7.4. Marcadores usados nos testes *AmpFISTR Identifiler Direct*<sup>®</sup> PCR Amplification Kit e *AmpFISTR Identifiler Plus*<sup>®</sup> PCR Amplification Kit<sup>27, 28</sup>**

<i>Locus STR</i>	<i>Corante</i>	<i>Localização no cromossoma</i>	<i>Sequência de repetição 5' -&gt;3'</i>
<b>Amelogenina</b>	PET <sup>®</sup>	Xp22.1–22.3 e Yp11.2	N.A.
<b>CSF1PO</b>	6-FAM <sup>®</sup>	5q33.3–34	AGAT
<b>FGA</b>	PET <sup>®</sup>	4q28	Complexo TTTC
<b>TH01</b>	VIC <sup>®</sup>	11p15.5	AATG
<b>TPOX</b>	NED <sup>®</sup>	2p24–2pter	AATG
<b>vWA</b>	NED <sup>®</sup>	12p13.31	Complexo TCTA
<b>D2S1338</b>	VIC <sup>®</sup>	2q35	[TGCC] <sub>n</sub> [TTCC] <sub>n</sub>
<b>D3S1358</b>	VIC <sup>®</sup>	3p	Complexo TCTA
<b>D5S818</b>	PET <sup>®</sup>	5q23.3–32	AGAT
<b>D7S820</b>	6-FAM <sup>®</sup>	7q11.21–22	GATA
<b>D8S1179</b>	6-FAM <sup>®</sup>	8q24.13	Complexo TCTA
<b>D13S317</b>	VIC <sup>®</sup>	13q22–q31	TATC
<b>D16S539</b>	VIC <sup>®</sup>	16q24.1	GATA
<b>D18S51</b>	NED <sup>®</sup>	18q21.3	AGAA
<b>D19S433</b>	NED <sup>®</sup>	19q12	(AAGG)(AAAG)(AAGG) (TAGG)[AAGG] <sub>n</sub>
<b>D21S11</b>	6-FAM <sup>®</sup>	21q11–21q21	Complexo TCTA

**Tabela 11** - Marcadores usados pelos dois testes *Life Technologies*<sup>®</sup>.

### 7.5. Marcadores usados nos testes *Investigator ESSplex Plus® Kit*<sup>29</sup>

<i>Locus STR</i>	Corante	Localização no cromossoma	Sequência repetitiva
<b>Amelogenina</b>	6-FAM	Xp22.1–22.3 Yp11.2	N.A.
<b>FGA</b>	BTY	4q28.2	Complexo TTTC
<b>TH01</b>	6-FAM	11p15.5	AATG
<b>vWA</b>	6-FAM	12p13.31	Complexo TCTA
<b>D1S1656</b>	BTG	1q42	Complexo [TAGA] <sub>n</sub> [TG] <sub>m</sub>
<b>D2S1338</b>	BTG	2q35	[TGCC] <sub>n</sub> [TTCC] <sub>n</sub>
<b>D2S441</b>	BTR	2p14	TCTA
<b>D3S1358</b>	6-FAM	3p25.3	Complexo TCTA
<b>D8S1179</b>	BTG	8q23.1–23.2	Complexo TCTA
<b>D10S1248</b>	BTY	10q26.3	GGAA
<b>D12S391</b>	BTY	12p13.2	Complexo AGAT
<b>D16S539</b>	BTG	16q24.1	GATA
<b>D18S51</b>	BTR	18q21.3	AGAA
<b>D19S433</b>	BTG	19q12	(AAGG)(AAAG)(AAG G) (TAGG)[AAGG] <sub>n</sub>
<b>D21S11</b>	6-FAM	21q21.1	Complexo TCTA
<b>D22S1045</b>	BTY	22q12.3	[ATT] <sub>n</sub>

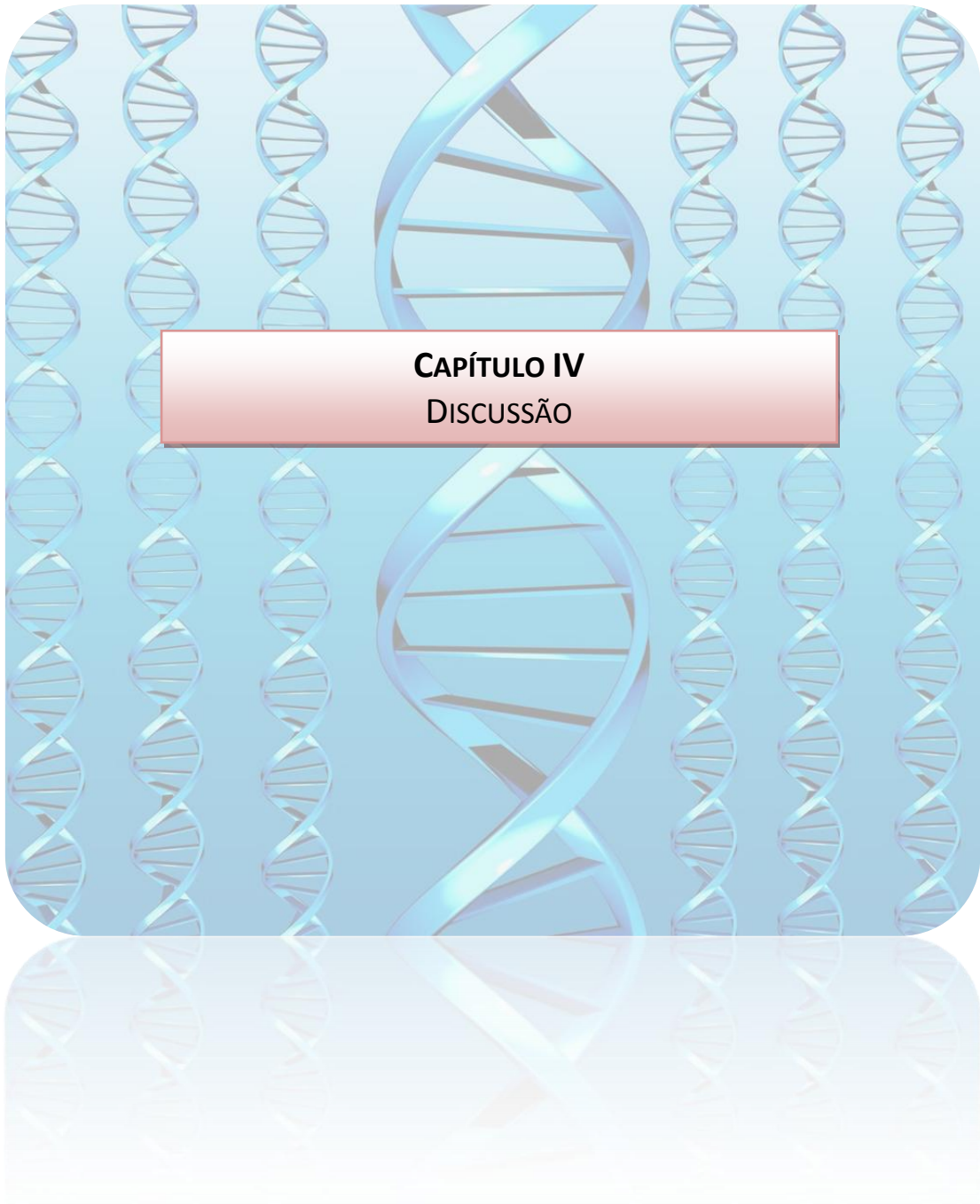
Tabela 12 – Marcadores usados *Investigator ESSplex Plus®*.

**7.6. Cruzando os dados obtidos dos testes utilizados por estes laboratórios e a Portaria 270/09, de 17 de março**

Marcadores usados			
Qiagen - ESSplex Plus	Promega - PowerPlex 16 e PowerPlex16 HS	Identifiler PCR	Portaria 270/09, de 17 de março
Amelogenina	Amelogenina	Amelogenina	Amelogenina
FGA	FGA	FGA	FGA
TH01	TH01	TH01	TH01
vWA	vWA	vWA	vWA
	Penta D		Penta D
	Penta E		Penta E
	TPOX	TPOX	TPOX
	CSF1PO	CSF1PO	CSF1PO
D1S1656			
D2S1338		D2S1338	D2S1338
D2S441			
D3S1358	D3S1358	D3S1358	D3S1358
	D5S818	D5S818	D5S818
	D7S820	D7S820	D7S820
D8S1179	D8S1179	D8S1179	D8S1179
D10S1248			
D12S391			
	D13S317	D13S317	D13S317
D16S539	D16S539	D16S539	D16S539
D18S51	D18S51	D18S51	D18S51
D19S433		D19S433	D19S433
D21S11	D21S11	D21S11	D21S11
D22S1045			
			FES
			F13A1
			F13B
			SE33
			CD4
			GABA

	Marcador que o teste não usa
	Marcador que o teste usa
	Marcador da Portaria usado por um ou mais teste
	Marcador usado por algum teste não presente na Portaria
	Marcador da Portaria não usado por nenhum teste

**Tabela 13** – cruzamento de dados entre os marcadores usados pelos testes e os constantes na Portaria 270/09, de 17 de março.



**CAPÍTULO IV**  
**DISCUSSÃO**



## 8. DISCUSSÃO

Como referido, o propósito deste trabalho era fazer uma comparação sobre os marcadores e as amostras usadas pelos diferentes laboratórios para a determinação da paternidade, e compreender se seria possível uma adulteração do resultado com base nessas diferenças.

No decorrer deste trabalho, verificou-se que não existe um procedimento uniforme para a execução destes testes.. Os laboratórios adotaram diferentes abordagens ao mesmo problema, usando diferentes amostras e diferentes combinações de testes, sendo que cada um destes testes possui uma combinação diferente de marcadores.

Os laboratórios pertencentes ao INMLCF, IP usam duas amostras de tecidos diferentes (sangue e saliva), submetendo cada amostra a um teste diferente. Este procedimento permite minimizar/descartar as hipóteses de quimerismo, isto é, de indivíduos provenientes da fusão de dois óvulos fecundados diferentes e que por essa razão tenham dois códigos genéticos distintos. De mosaicismo genético que poderá ocorrer na fase embrionária, quando por algum dos processos de mutação, células totipotentes ficam com uma diferença no seu ADN, fazendo com que o indivíduo tenha variação no seu ADN. E casos de microquimerismo, como o de mulheres que tiveram filhos, e que mantém em circulação células embrionárias do descendente, e que podem interferir no teste. Neste procedimento são analisados um total de 17 marcadores mais amelogenina.

O laboratório do IPATIMUP referiu usar somente sangue como amostra, mas submete essa amostra a dois testes diferentes, tendo escolhido dois testes que asseguram o maior número possível de marcadores (20 marcadores no total mais amelogenina). A análise destes 20 marcadores permite obter um CPI muito elevado, resultando por isso, numa probabilidade de paternidade também ela muito elevada. Contudo, não permite descartar laboratorialmente as hipóteses de quimerismo, microquimerismo e mosaicismo genético.

Os laboratórios *CGC Genetics*<sup>®</sup> e *DNA Medical*<sup>®</sup> usam somente um teste e uma amostra, preferindo usar como amostra, raspado bucal. O resultado é atribuído assim através da análise de 15 marcadores. A vantagem do uso de raspado bucal está no menor custo quando comparado ao duplo teste e na maior facilidade em manipular a amostra. O raspado bucal tem ainda a vantagem face a amostra sanguínea, de não ter variações em transplantados, nomeadamente de medula. Contudo esta técnica isolada não permite descartar a hipótese de quimerismo, microquimerismo ou mosaicismo genético laboratorialmente.

Relativamente aos intervenientes do teste, os laboratórios do INMLCF, IP e o IPATIMUP afirmaram usar preferencialmente o trio pai-mãe e filho, remetendo o uso da dupla pai-filho para casos aonde não é possível obter dados da respetiva mãe. O *CGC Genetics*<sup>®</sup> afirmou efetuar ambos os testes dependendo da vontade de quem o procura. O laboratório *DNA Medical*<sup>®</sup> usa por rotina a dupla pai-filho, segundo informação disponibilizada na sua página da internet. A vantagem do uso do trio está no cálculo da probabilidade de paternidade que terá sempre uma certeza superior. Contudo o uso da dupla pai-filho fornece um menor custo do exame.

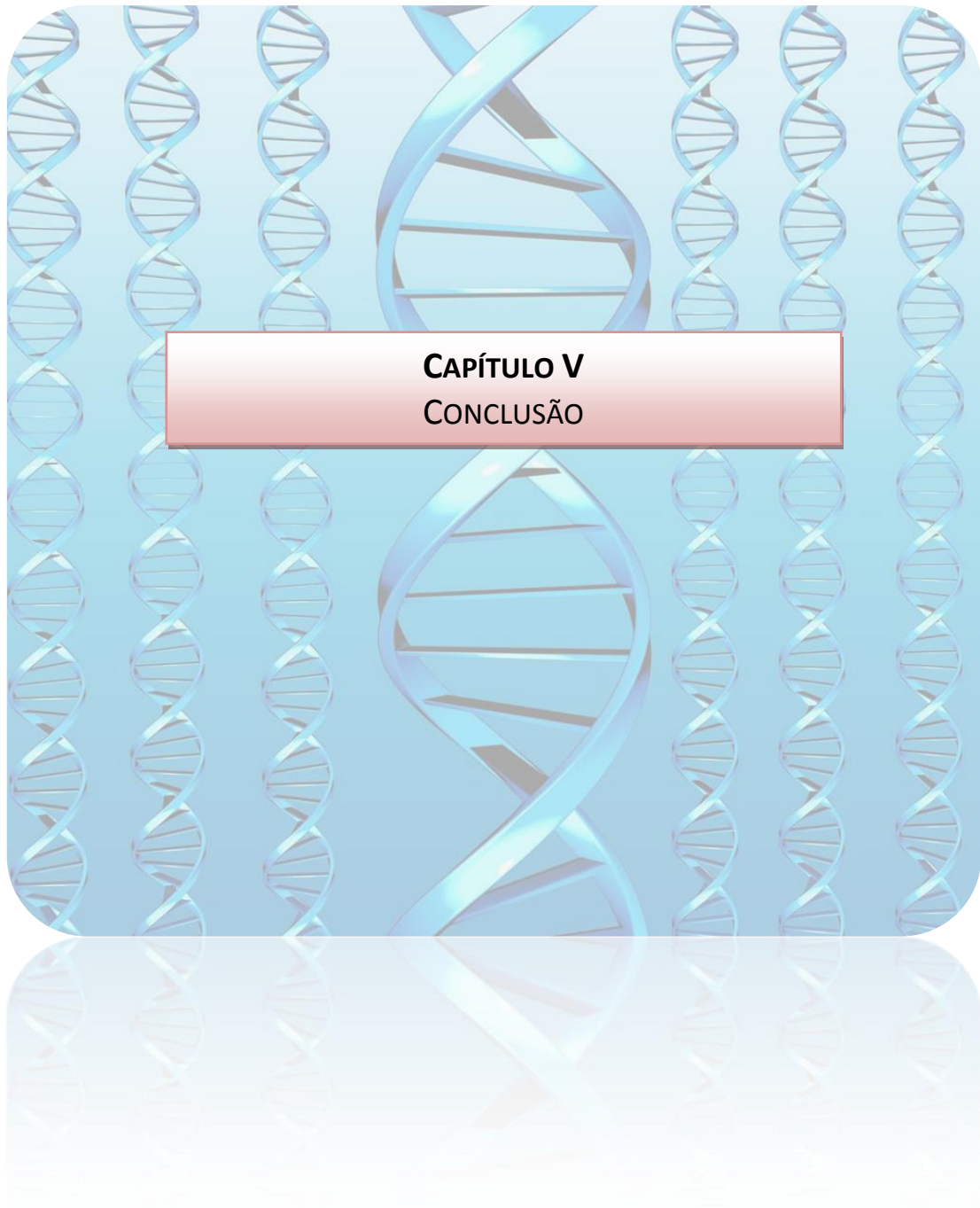
No decorrer deste estudo, verificou-se que todos os laboratórios referidos possuem mecanismos para assegurar a concordância dos resultados. Estes estudos são elaborados através de análise de uma amostra enviada por um laboratório superior, que é analisada pelos diferentes laboratórios sendo depois comprovados os resultados.

Quando cruzamos os marcadores usados pelos diferentes *kits*, verificamos que são usados muitos marcadores diferentes entre si, havendo cinco marcadores usados pelo teste ESSplex plus<sup>®</sup> que não constam na Portaria 270/09, de 17 de março, são eles o D1S1656, D2S441, D22S1045, D10S1248 e D12S391. Este facto pode ser explicável se tivermos em conta que o ESSplex plus<sup>®</sup> foi lançado para o mercado em 2010 e a Portaria publicada em 2009.

Existem marcadores constantes na Portaria 270/09, de 17 de março que não são usados por nenhum dos testes comerciais identificados neste trabalho, como o marcador FES, F13A1, F13B, SE33, CD4 e GABA. Coloca-se então a questão se será possível selecionar 15 marcadores entre todos os identificados, incluindo estes seis, e através do uso de mutações que naturalmente poderão existir na população, tentar-se encontrar uma dupla exclusão, baixando desta forma o CPI e negativando o teste de paternidade.

De referir, que a concordância de resultados entre os diferentes *kits* identificados por este trabalho está validada segundo informação divulgada pelos próprios fabricantes. Contudo, nada é referido relativamente aos marcadores identificados no parágrafo anterior.

Este tema apresenta assim uma grande importância médico-legal, uma vez que, parece plausível que a prova genética possa ser alterada através da seleção de alguns dos marcadores constantes na Portaria 270/09, de 17 de março e dos diferentes testes disponíveis no mercado, no sentido de ser obtida prova ou contraprova de conveniência e não a procura da verdade, como o legislador entendeu. Todavia, na história da humanidade, não existe memória de atribuição da paternidade, com tanta certeza como atualmente.



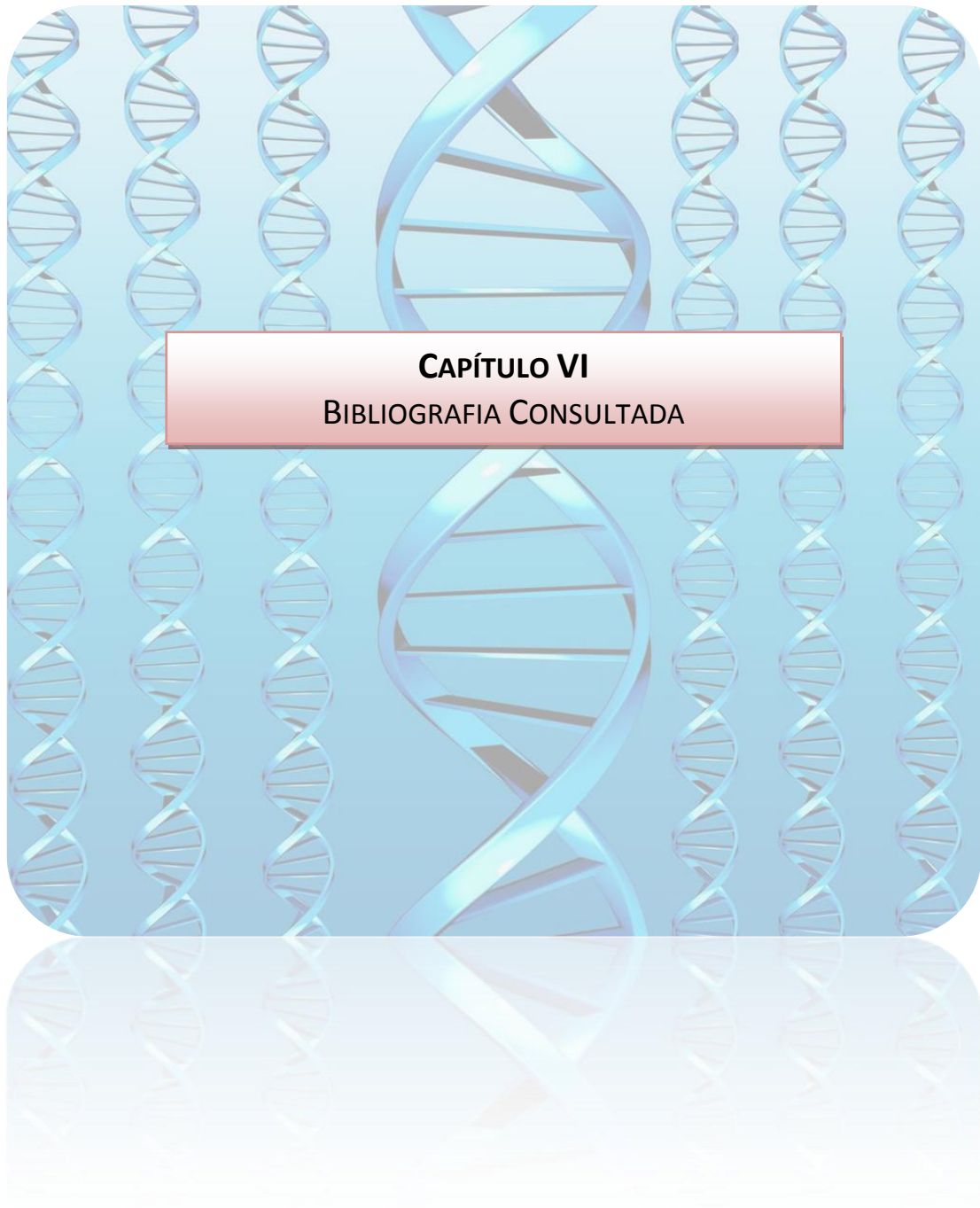
**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSÃO**



## 9. CONCLUSÃO

- Atualmente são usados pelos laboratórios Portugueses vários testes para o esclarecimento da paternidade. Esses testes usam vários marcadores diferentes entre si, havendo seis constantes na Portaria 270/09, de 17 de março, que não são usados e cinco marcadores que são usados e não constam nesta Portaria.
- Dos laboratórios consultados, o IPATIMUP é o que utiliza maior combinação de marcadores, no total 20 mais amelogenina, seguindo do INMLCF, IP com 17 marcadores mais amelogenina.
- Somente os laboratórios do INMLCF, IP usam duas amostras distintas tratando-as em simultâneo.
- Parece plausível que possam ser usados todos os marcadores publicados na Portaria 270/2009, de 17 de março, juntamente com aqueles que sendo usados pelos *kits* comerciais não constem na referida Portaria, no sentido de se averiguar a existência de mutações. E em caso afirmativo, fazer uma seleção dos marcadores, com vista a identificar uma dupla exclusão, diminuindo assim o PI e desta forma negar o teste de paternidade.





**CAPÍTULO VI**  
**BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**



## 10. Bibliografia

### 10.1. Bibliografia Consultada

- 1 – Wecht C.; (junho 2005); *The History of Legal Medicine*; Journal of the American Academy of Psychiatry and the Law; Pág. 245-251.
- 2 – Sousa T.; (agosto 2003); *A Medicina Forense em Portugal*; 1ª Edição; Coimbra; Mar da Palavra.
- 3 – Decreto-Lei n.º 373/75, de 17 de julho.
- 4 – Decreto-Lei n.º 96/2001, de 26 de março.
- 5 – Decreto-Lei 131/2007, de 27 de abril, regulamentado pela Portaria 522/2007, de 30 de abril.
- 6 – Decreto-Lei 166/2012, de 31 de julho, retificado pela Declaração de Retificação 54/2012.
- 7 – Portaria 19/2013, de 21 de janeiro.
- 8 – Silva A., Gramaxo F., Santos M., Mesquita A., Baldaia L.; (2000); *Terra Universo de Vida*; Capítulo II; Porto; Porto Editora.
- 9 – Lewin B.; (2001); *Genes VII*; Capítulos 1, 4 e 5; Porto Alegre; Artmed.
- 10 – Watson J., Crick F; (abril 1953); *A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*; Nature.
- 11 – Lei 5/2008, de 12 de fevereiro.
- 12 – <http://www.dnajunction.com/history/serological-detection.php>, consultado em 13 de setembro de 2013.
- 13 – Thomas J., Kindt T., Osborne B., Goldsby R.; (2006); *Kuby Immunology, VI Ed.*; Capítulo I e VII; W. H. Freeman & Company.
- 14 – Terasaki P.; (janeiro 1978); *HLA in paternity testing*; The western Journal of Medicine.
- 15 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>, consultado em 05 de junho de 2013, às 15h20.
- 16 – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>, consultado em 05 de junho de 2013, às 15h25.
- 17 – Quiagen N.V.®; (abril 2013); *Investigator IDproof Calculation Guide*, Velo, Holanda.
- 18 – Moroni et al; (2011); *Effects of Reference Population and Number of STR Markers on Positive Evidence in Paternity Testing*; J. Forensic Res.
- 19 – Código Civil Português, 62ª versão - Decreto-Lei 47344/66, de 25 de novembro, atualizado pelas sucessivas alterações até à versão atual - Lei 23/2013 de 05 de março.
- 20 – Código de Processo Civil – Lei 41/2013, de 26 de junho, com retificação n.º36/2013, de 12 de agosto.
- 21 – Código Penal Português, 30ª versão – Decreto-Lei 48/95, de 15 de março, atualizado pelas sucessivas alterações até à versão atual - Decreto-Lei 60/2013, de 23 de agosto.

**22** – Código de Processo Penal, 25ª versão – Decreto-Lei 78/87, de 17 de fevereiro, atualizado pelas sucessivas alterações até à versão atual – Retificação n.º 21/2013, de 19 de abril.

**23** – [http://en.wikipedia.org/wiki/Chain\\_of\\_custody](http://en.wikipedia.org/wiki/Chain_of_custody), consultado em 1 de agosto de 2013, às 11h20.

**24** – <http://www.aefml.pt/download/medicina2005/medicinalegal/Med%20CSI.pdf>, consultado em 12 de setembro de 2013, às 16h45.

**25** – Promega Corporation®; (junho 2012); *Technical Manual - PowerPlex 16 HS® System*; Madison, WI, EUA.

**26** – Promega Corporation®; (junho 2013); *Technical Manual - PowerPlex 16® System*; Madison, WI, EUA.

**27** – Life Technologies Corporation®; (março 2012); *AmpFISTR Identifiler Plus®*, *User's Guide*; Foster City, CA, EUA.

**28** – Life Technologies Corporation®; (junho 2012); *AmpFISTR Identifiler Direct®*, *User's Guide*, Foster City, CA, EUA.

**29** – Qiagen N.V.®; (agosto 2011); *Investigator ESSplex Plus® Handbook*; Velo, Holanda.

## 10.2. Fonte das imagens utilizadas

**Figura 1** – <http://thinkbio.files.wordpress.com/2012/02/f22-19.jpg>, consultado em 30 de abril de 2013, às 18h10.

**Figura 2** – [http://www.nature.com/scitable/nated/content/18491/sadava\\_11\\_1\\_large\\_2.gif](http://www.nature.com/scitable/nated/content/18491/sadava_11_1_large_2.gif), consultado em 30 de abril de 2013, às 19h.

**Figura 3** – <http://dnabioc.wikispaces.com/file/view/hersheychaseexpt.jpg/33694573/hersheychaseexpt.jpg>, consultado em 30 de abril de 2013, às 22h10.

**Figura 4** – <http://www.sulinformacao.pt/wp-content/uploads/imagem-de-um-cristal-de-ADN-atrav%C3%AAs-de-cristalografia-d-difrac%C3%A7%C3%A3o-de-raios-x1.jpg>, consultado em 30 de abril de 2013, às 23h.

**Figura 5** – <http://dc108.4shared.com/doc/5EdcOF65/preview006.png>, consultado em 01 de maio de 2013, às 0h15.

**Figura 6** – <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR728500-750.jpg>, consultado em 4 de maio de 2013, às 15h10.

**Figura 8 e 9** – <https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Applications/DNA%20Amplification%20and%20PCR/pcr.jpg>, consultado em 4 de maio de 2013, às 17h45.

**Figura 10 e 11** – Promega Corporation®; (junho 2013); *Technical Manual - PowerPlex 16® System*; Madison, WI, EUA.

**Figura 12** – Life Technologies Corporation®; (março 2012); *AmpFISTR Identifiler Plus®*, *User's Guide*; Foster City, CA, EUA.

**Figura 13** – Qiagen N.V.®; (agosto 2011); *Investigator ESSplex Plus® Handbook*; Velo, Holanda.

**Figura usada como separador entre capítulos** – [http://4.bp.blogspot.com/\\_CROmZlwZYP0/TTXyf95dKAI/AAAAAAAAVhk/phEPyUo3-M4/s1600/dna.jpg](http://4.bp.blogspot.com/_CROmZlwZYP0/TTXyf95dKAI/AAAAAAAAVhk/phEPyUo3-M4/s1600/dna.jpg), consultado em 4 de maio de 2013, às 22h.

### 10.3. Gráfico utilizado

**Gráfico 1** – [http://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/13338615/andrews\\_figure4\\_ksm.jpg](http://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/13338615/andrews_figure4_ksm.jpg), consultado em 11 de maio de 2013, às 15h35.

### 10.4. Tabelas usadas

**Tabela 2** – Portaria 270/2009, de 17 de março.

**Tabela 3** – [http://www.nfstc.org/pdi/Subject07/pdi\\_s07\\_m02\\_06\\_b.htm](http://www.nfstc.org/pdi/Subject07/pdi_s07_m02_06_b.htm), consultado em 06 de junho de 2013, às 14h35.

**Tabela 4** – <http://www.nfstc.org/pdi/Subject057/pdi.htm>, consultado em 06 de junho de 2013, às 14h45.

**Tabela 5** – Taroni F., Aitken C.; (julho 2004); *Statistics and the Evaluation of Evidence for Forensic Scientists*; II edição; pág. 317; Wiley-Blackwell; Chichester Inglaterra.

**Tabela 6** – <http://www.docstoc.com/docs/152674958/NocoosGeraisCF>, consultado em 11 de junho, às 16h45.

**Tabela 7** – Qiagen N.V.<sup>®</sup>; (agosto 2011); *Investigator ESSplex Plus<sup>®</sup> Handbook*; Velo, Holanda.

**Tabela 10** – Promega Corporation<sup>®</sup>; (junho 2012); *Technical Manual - PowerPlex 16 HS<sup>®</sup> System*; Madison, WI, EUA. E Promega Corporation<sup>®</sup>; (junho 2013); *Technical Manual - PowerPlex 16 System<sup>®</sup>*; Madison, WI, EUA.

**Tabela 11** – Life Technologies Corporation<sup>®</sup>; (março 2012); *AmpFISTR Identifier Plus<sup>®</sup>, User's Guide*; Foster City, CA, EUA. E Life Technologies Corporation<sup>®</sup>; (junho 2012); *AmpFISTR Identifier Direct<sup>®</sup>, User's Guide*, Foster City, CA, EUA.

**Tabela 12** – Qiagen N.V.<sup>®</sup>; (agosto 2011); *Investigator ESSplex Plus<sup>®</sup> Handbook*; Velo, Holanda.

**Tabela 14** – Promega Corporation<sup>®</sup>; (junho 2012); *Technical Manual - PowerPlex 16 HS<sup>®</sup> System*; Madison, WI, EUA.

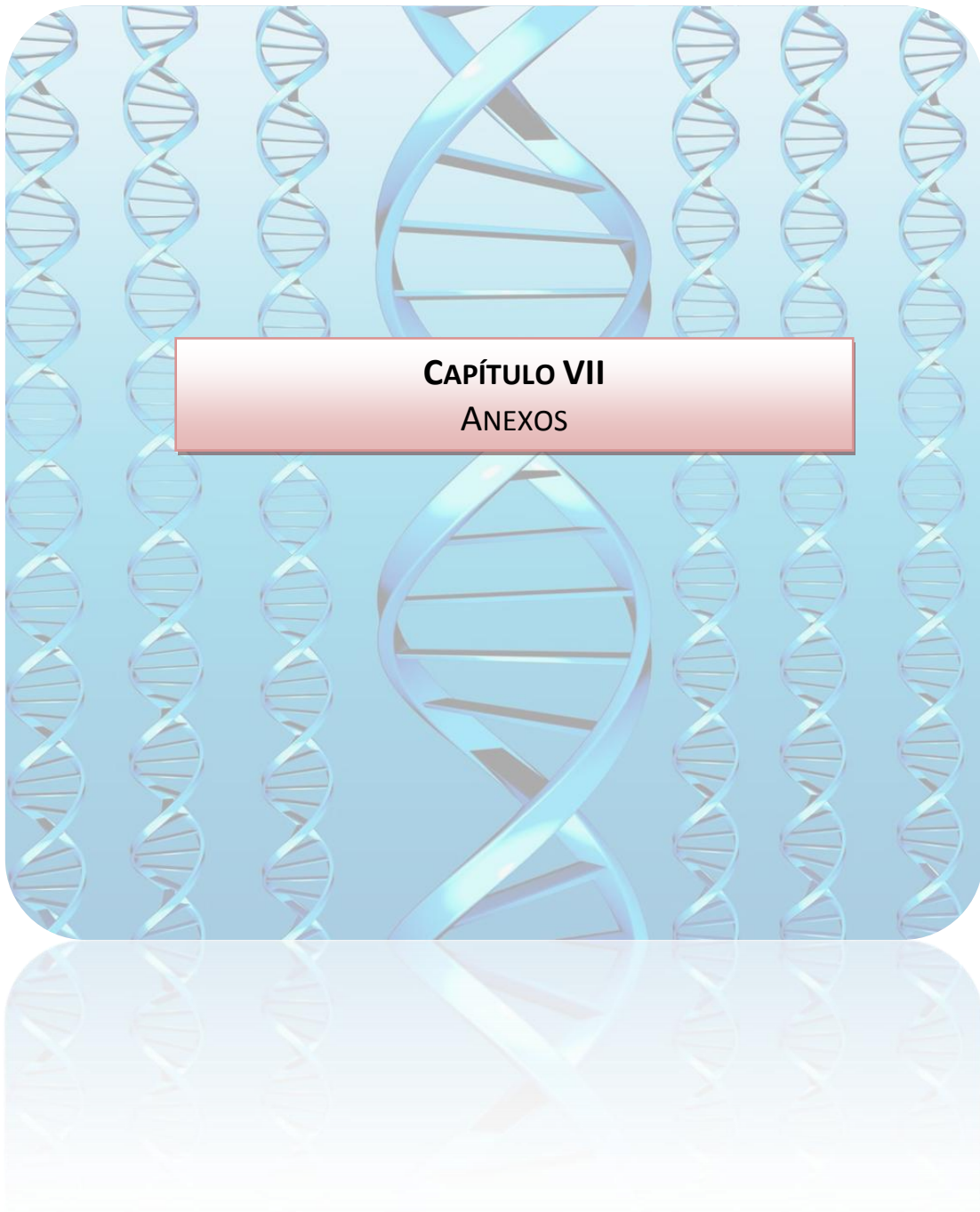
Promega Corporation<sup>®</sup>; (junho 2013); *Technical Manual - PowerPlex 16<sup>®</sup> System*; Madison, WI, EUA.

Life Technologies Corporation<sup>®</sup>; (março 2012); *AmpFISTR Identifier Plus<sup>®</sup>, User's Guide*; Foster City, CA, EUA.

Life Technologies Corporation<sup>®</sup>; (junho 2012); *AmpFISTR Identifier Direct<sup>®</sup>, User's Guide*, Foster City, CA, EUA.

Qiagen N.V.<sup>®</sup>; (agosto 2011); *Investigator ESSplex Plus<sup>®</sup> Handbook*; Velo, Holanda.







## 11. ANEXOS

### 11.1. Anexo I

#### ***Promega Corporation***<sup>®</sup>

#### ***PowerPlex 16***<sup>®</sup> ***System*** e ***PowerPlex 16 HS***<sup>®</sup> ***System***

O *PowerPlex 16*<sup>®</sup> *System* e o *PowerPlex 16 H*<sup>®</sup> *System* são kits comerciais usados para estudos genéticos. Eles pertencem à *Promega Corporation*<sup>®</sup> e foram desenhados para permitir uma análise qualitativa de 16 *loci* específicos, incluindo a amelogenina para determinação do sexo.<sup>25, 26</sup>

O kit *PowerPlex 16*<sup>®</sup> *System* surgiu primeiramente no mercado em 2000. O teste consegue gerar perfis completos com 0,125ng de ADN (com PCR prévia). O *PowerPlex 16 HS*<sup>®</sup> *System* foi lançado no mercado em 2009 e apresenta uma maior sensibilidade podendo gerar perfis completos com somente 0,0625ng (com PCR prévia).<sup>25, 26</sup>

#### **a) Quantificação do ADN e PCR**

A quantificação do ADN presente na amostra é fundamental. Visa diminuir custos desnecessários, evitar obter excesso de fluorescência que depois dificultem a leitura dos resultados, bem como evitar a não adição das adeninas terminais (3').<sup>25, 26</sup>

No protocolo do *PowerPlex 16*<sup>®</sup> *System* e o *PowerPlex 16 HS*<sup>®</sup> *System* não são referidos métodos particulares para quantificação da amostra. No sítio da *Promega*<sup>®</sup> é sugerido o uso da *GoTaq*<sup>®</sup> *qPCR Master Mix*, uma *real-time* PCR, que permite amplificar o ADN em tempo real, através de espectrofotometria ( $\lambda=260\text{nm}$ ) e do uso de um corante Carboxi-X-Rodamina (CRX).

Os sistemas da *Promega*<sup>®</sup> estão otimizados para amplificação com termocilador *GeneAmpR PCR System 9700*, *GeneAmpR PCR Systems 9600*<sup>®</sup> ou *2400*<sup>®</sup> e para o modelo *Perkin-Elmer 480*<sup>®</sup>.<sup>25, 26</sup>

A amplificação é efetuada com a *AmpliAq GoldR DNA polymerase*<sup>®</sup>.<sup>25, 26</sup>

#### **b) Controlos usados pelos testes**

Na execução do teste genético é imprescindível efetuar o controlo positivo e o controlo negativo. No controlo positivo é simulado um circuito laboratorial completo, mas de onde se parte de uma solução controlo cujo conteúdo é conhecido com exatidão. No controlo negativo é criada uma amostra que segue todo o circuito laboratorial mas esta não contém ADN.<sup>25, 26</sup>

No protocolo dos testes *PowerPlex 16*<sup>®</sup> *System* e *PowerPlex 16 HS*<sup>®</sup> *System* é referido o uso do controlo 2800M (constituição deste em anexo). Como resultado, o controlo positivo deve originar um ou dois picos dependendo dos marcadores que contém e o controlo negativo não deve originar pico nenhum.<sup>25, 26</sup>

### **c) Padrão usado nos testes**

Para calcular o tamanho de cada fragmento é necessário ter um padrão constituído por diferentes comprimentos pré-estabelecidos e cuja concentração é conhecida com rigor.<sup>25, 26</sup>

O padrão usado por estes testes é o *Internal Lane Standard 600*<sup>®</sup>. São usados os tamanhos de 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550 e 600 pares de bases. Cada fragmento é corado com CXR, sendo detetada em separado como quarta cor.<sup>25, 26</sup>

### **d) Detecção dos fragmentos de ADN e sua interpretação estatística**

Os testes *PowerPlex 16*<sup>®</sup> *System* e *PowerPlex 16 HS*<sup>®</sup> *System* podem utilizar para a deteção dos fragmentos de ADN a seguinte instrumentação:<sup>25, 26</sup>

- *Applied Biosystems 3500*<sup>®</sup> ou *3500xL*<sup>®</sup>;
- *ABI PRISM 3100*<sup>®</sup> ou *3100-Avant*<sup>®</sup>;
- *ABI PRISM 3130*<sup>®</sup> ou *3130xl*<sup>®</sup>;
- *ABI PRISM 310*<sup>®</sup>.

A interpretação estatística dos resultados, tal como referido, é efetuada recorrendo a *software* específico. No manual da *Promega*<sup>®</sup> é recomendado o uso do *GeneMapper*<sup>®</sup> *ID-X Software*.<sup>25, 26</sup>

e) Exemplo dos resultados obtidos pelos testes **PowerPlex 16<sup>®</sup> System** e **PowerPlex 16 HS<sup>®</sup> System**<sup>25, 26</sup>

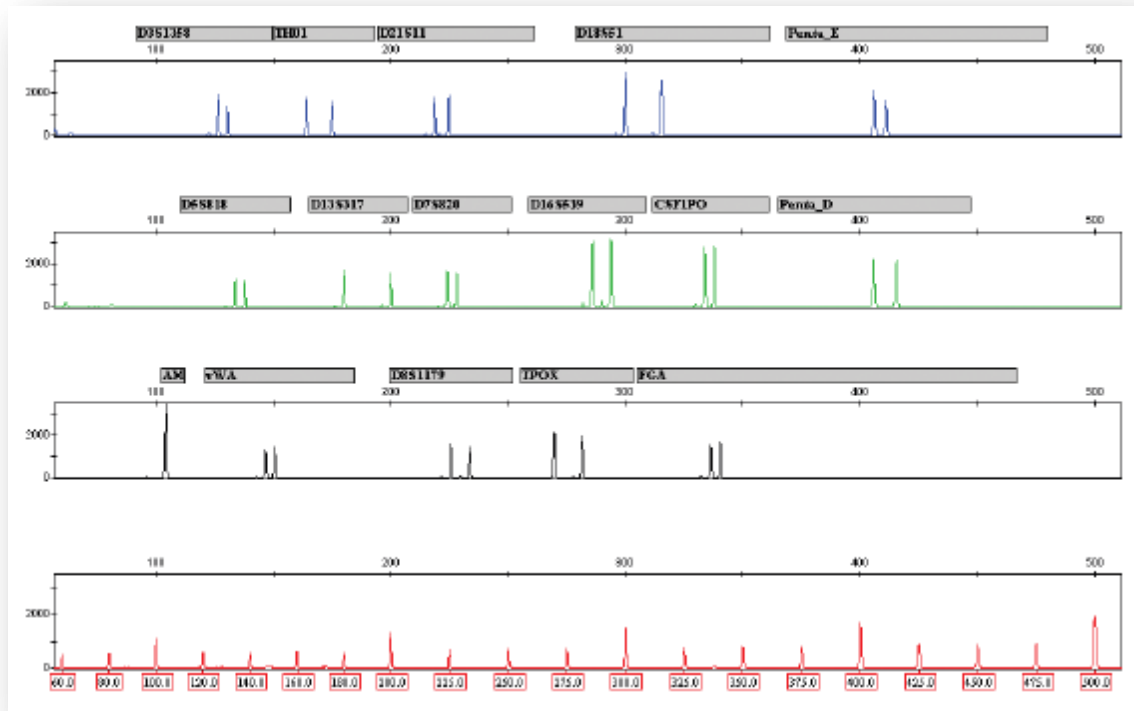


Figura 10 – Exemplo dos resultados obtido pelo teste PowerPlex 16<sup>®</sup> System (com 1ng de ADN).

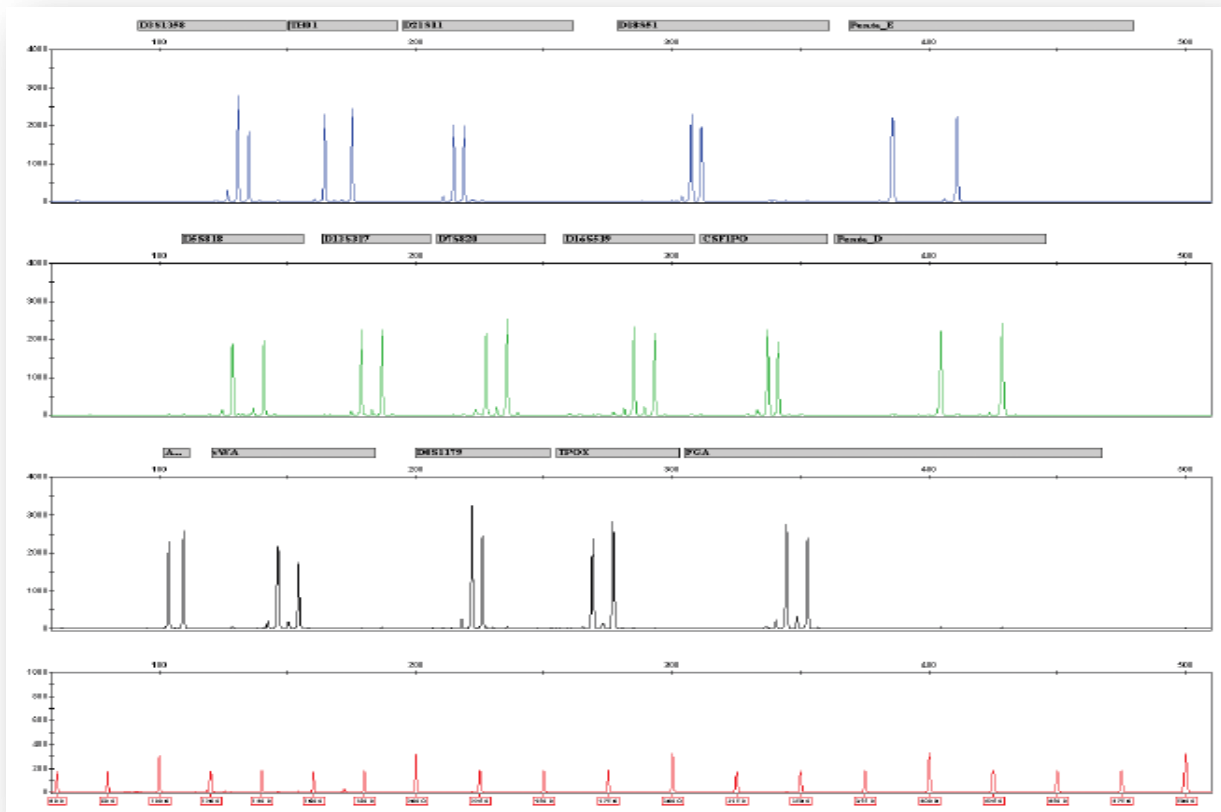


Figura 11 – Exemplo dos resultados obtido pelo teste PowerPlex 16HS<sup>®</sup> System (com 0,5ng de ADN).

## 11.2. Anexo II

### Da *Life Technologies Corporation*<sup>®</sup>

#### *AmpFISTR Identifiler Direct*<sup>®</sup> *PCR Amplification Kit* e o *AmpFISTR Identifiler Plus*<sup>®</sup> *PCR Amplification Kit*

O *AmpFISTR Identifiler Direct*<sup>®</sup> *PCR Amplification Kit* e o *AmpFISTR Identifiler Plus*<sup>®</sup> *PCR Amplification Kit* são kits comerciais usados para estudos genéticos. Pertencem à *Life Technologies Corporation*<sup>®</sup> e foram desenhados para permitir a análise qualitativa de 16 *loci* específicos incluindo a amelogenina para determinação do sexo.<sup>27, 28</sup>

O kit *AmpFISTR Identifiler Direct*<sup>®</sup> surgiu primeiramente no mercado em 2009. O *AmpFISTR Identifiler Plus*<sup>®</sup> foi lançado no ano seguinte em 2010. Ambos conseguem gerar perfis completos com amostras de 0,125ng de ADN (sujeitos a PCR prévia).<sup>27, 28</sup>

#### a) Quantificação do ADN e PCR

A quantificação do ADN antes da PCR é uma necessidade que visa diminuir custos desnecessários, evitar obter excesso de fluorescência que depois dificultem a leitura dos resultados, e evitar a não adição das adeninas terminais (3').<sup>27, 28</sup>

A quantificação do ADN é efetuada com o *Quantifiler Human DNA*<sup>®</sup> *Quantification Kit* e *Quantifiler Y Human Male DNA*<sup>®</sup> *Quantification Kit* ou o *Quantifiler Duo DNA*<sup>®</sup> *Quantification Kit* e o número de ciclos usado no PCR depende da quantidade de ADN que a amostra tiver.<sup>27, 28</sup>

Os testes da *Life Technologies*<sup>®</sup> estão otimizados para amplificação com termociclador *GeneAmp*<sup>®</sup> *PCR System 9700* ou *Veriti*<sup>®</sup> *96-Well Thermal Cycler*.<sup>27, 28</sup>

A amplificação é efetuada com a *AmpliTaq GoldR DNA polymerase*<sup>®</sup>.<sup>27, 28</sup>

#### b) Controlos usados pelo teste

Na execução do teste genético é imprescindível efetuar o controlo positivo e o controlo negativo. No controlo positivo é simulado um circuito laboratorial completo, mas de onde se parte de uma solução controlo cujo conteúdo é conhecido com exatidão. No controlo negativo é criada uma amostra que segue todo o circuito laboratorial mas esta não contém ADN.<sup>27, 28</sup>

No protocolo dos testes *AmpFISTR Identifiler Direct*<sup>®</sup> *PCR Amplification Kit* e *AmpFISTR Identifiler Plus*<sup>®</sup> *PCR Amplification Kit* é referido o uso do controlo 9947A (constituição desta solução em anexo). Assim o controlo positivo deve originar um ou dois picos dependendo dos marcadores que contém e o controlo negativo não originar dar pico nenhum.<sup>27, 28</sup>

### **c) Padrão usado no teste**

#### ➤ *AmpFISTR Identifiler Direct<sup>®</sup> PCR Amplification Kit*

Para calcular o tamanho de cada fragmento é necessário ter um padrão constituído por diferentes comprimentos pré-estabelecidos e cuja concentração é conhecida com rigor.<sup>28</sup>

O padrão usado por este teste é o *GeneScan 500 LIZ<sup>®</sup> Size Standard*, sendo usados os tamanhos de 75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 350, 400 e 450 nucleótidos.<sup>28</sup>

Outro padrão que pode ser utilizado é o *GeneScan 600 LIZ<sup>®</sup> Size Standard v2.0* nos tamanhos 80, 100, 114, 120, 140, 160, 180, 200, 214, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 314, 320, 340, 360, 380, 400, 414, 420, 440 e 460 pares de bases.<sup>28</sup>

Cada fragmento é marcado com o corante *LIZ*, sendo detetada em separado como quinta cor.<sup>28</sup>

#### ➤ *AmpFISTR Identifiler Plus<sup>®</sup> PCR Amplification Kit*

O padrão usado deste teste é o *GeneScan 500 LIZ<sup>®</sup> Size Standard*, sendo usados os tamanhos de 75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 350, 400 e 450 pares de bases.<sup>27</sup>

Cada fragmento corado com *LIZ<sup>®</sup>*, sendo detetada em separado como quinta cor.<sup>27</sup>

### **d) Detecção dos fragmentos de ADN e sua interpretação estatística**

Os testes *AmpFISTR Identifiler Plus<sup>®</sup> PCR Amplification Kit* e *AmpFISTR Identifiler Direct<sup>®</sup> PCR Amplification Kit* estão otimizados para utilizar para a deteção dos fragmentos de ADN a seguinte instrumentação:<sup>27, 28</sup>

- *Applied Biosystems 3500<sup>®</sup> ou 3500xL<sup>®</sup>*;
- *ABI PRISM 3130<sup>®</sup> ou 3130xl<sup>®</sup>*;
- *ABI PRISM 3100<sup>®</sup> ou 3100 avant<sup>®</sup>*;
- *Applied Biosystems 3730<sup>®</sup>*.

A interpretação estatística dos resultados, tal como referido, é efetuada recorrendo a *software* específico. No manual da *Promega<sup>®</sup>* é recomendado o uso do *GeneMapper<sup>®</sup> ID-X Software* ou *GeneMapper<sup>®</sup> ID Software*.<sup>27, 28</sup>

**e) Exemplo dos resultados obtidos no teste *AmpFISTR Identifiler Plus*<sup>®</sup> PCR Amplification Kit<sup>27</sup>**

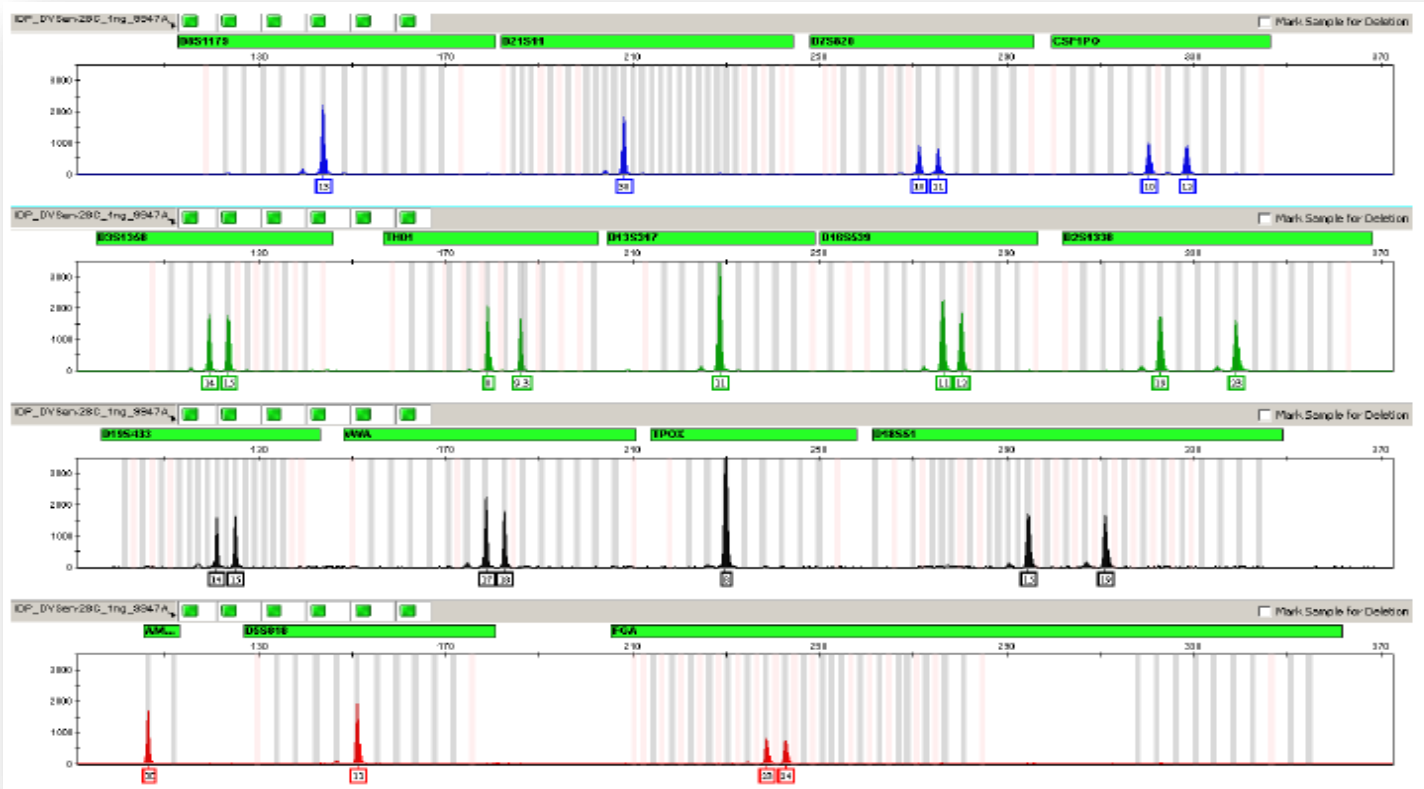


Figura 12 – Exemplo dos resultados obtidos pelo teste *AmpFISTR Identifiler Plus*<sup>®</sup> PCR Amplification Kit (com 1ng de ADN).

### 11.3. Anexo III

#### **Da Qiagen N.V.<sup>®</sup> *Investigator ESSplex Plus<sup>®</sup> Kit***

O *Investigator ESSplex Plus<sup>®</sup> Kit* é um *kit* comercial usado para estudos genéticos. Pertence à *Qiagen N.V.<sup>®</sup>* e foi desenhado para permitir a análise qualitativa de 16 *loci* específicos incluindo a amelogenina para determinação do sexo.<sup>29</sup>

Surgiu no mercado em 2010. Este *kit* consegue gerar perfis completos com somente 0,100ng de ADN, quando sujeitos a PCR prévia.<sup>29</sup>

#### **a) Quantificação do ADN e PCR**

Como já referido a quantificação do ADN antes da PCR é uma necessidade. A *Qiagen N.V.<sup>®</sup>* desenvolveu um aparelho, o *Rotor-Gene Q<sup>®</sup>*, um *multiple real-time PCR*, que permite quantificar o ADN presente enquanto decorrem os ciclos da PCR, podendo ser usadas várias amostras de cada vez.<sup>29</sup>

Este teste também está validado para o uso de termocicladores de outros fabricantes, como *UNO-Thermo Block<sup>®</sup>*, *MJ Research DNA Engine<sup>®</sup> PTC-200 Peltier Thermal Cycler<sup>®</sup>*, *GeneAmp PCR System 9700<sup>®</sup>*.<sup>29</sup>

A quantificação do ADN é efetuada recorrendo ao *Investigator Quantiplex HYres<sup>®</sup> Kit* (específico para ADN masculino) ou o *Investigator Quantiplex<sup>®</sup> Kit*, o número de ciclos usado no PCR depende da quantidade de ADN que a amostra tiver.<sup>29</sup>

A amplificação é efetuada com a *HotStarTaq Plus<sup>®</sup> DNAPolymerase*.<sup>29</sup>

#### **b) Controlo usado pelo teste**

Na execução deste teste genético também é usado um controlo positivo e outro negativo.<sup>29</sup>

No protocolo dos testes *Investigator ESSplex Plus<sup>®</sup> Kit* é referido o uso do controlo *DNA XY13* (constituição desta solução em anexo).<sup>29</sup>

#### **c) Padrão usado no teste *Investigator ESSplex Plus<sup>®</sup> Kit***

O padrão deste teste é o *DNA size standard 550 (BTO)*, sendo usados os tamanhos de 60, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 425, 450, 475, 500, 525, e 550 pares de bases.<sup>29</sup>

Cada fragmento é corado com *BTO*, sendo detetada em separado como quinta cor.<sup>29</sup>

#### d) Detecção dos fragmentos de ADN e sua interpretação estatística

Os testes *Investigator ESSplex Plus*<sup>®</sup> Kit estão otimizados para utilizar para a deteção dos fragmentos de ADN a seguinte instrumentação:<sup>29</sup>

- *Applied Biosystems 3500*<sup>®</sup> ou *3500xl*<sup>®</sup>;
- *ABI PRISM 3130*<sup>®</sup> ou *3130xl*<sup>®</sup>;
- *ABI PRISM 310*<sup>®</sup>;
- *ABI PRISM 3100/3100-avant*<sup>®</sup>.

A interpretação estatística dos resultados, tal como referido, é efetuada recorrendo a software específico. No manual da *Qiagen*<sup>®</sup> é recomendado o uso do *QIAGEN Investigator IDproof*<sup>®</sup>, *Investigator IDproof Mixture Software*<sup>®</sup>, *GeneMapper ID*<sup>®</sup>, *GeneMapper ID-X*<sup>®</sup>, ou *Genotyper Software*<sup>®</sup>.<sup>29</sup>

#### e) Exemplo dos resultados obtidos no teste *Investigator ESSplex Plus*<sup>®</sup> Kit.<sup>29</sup>

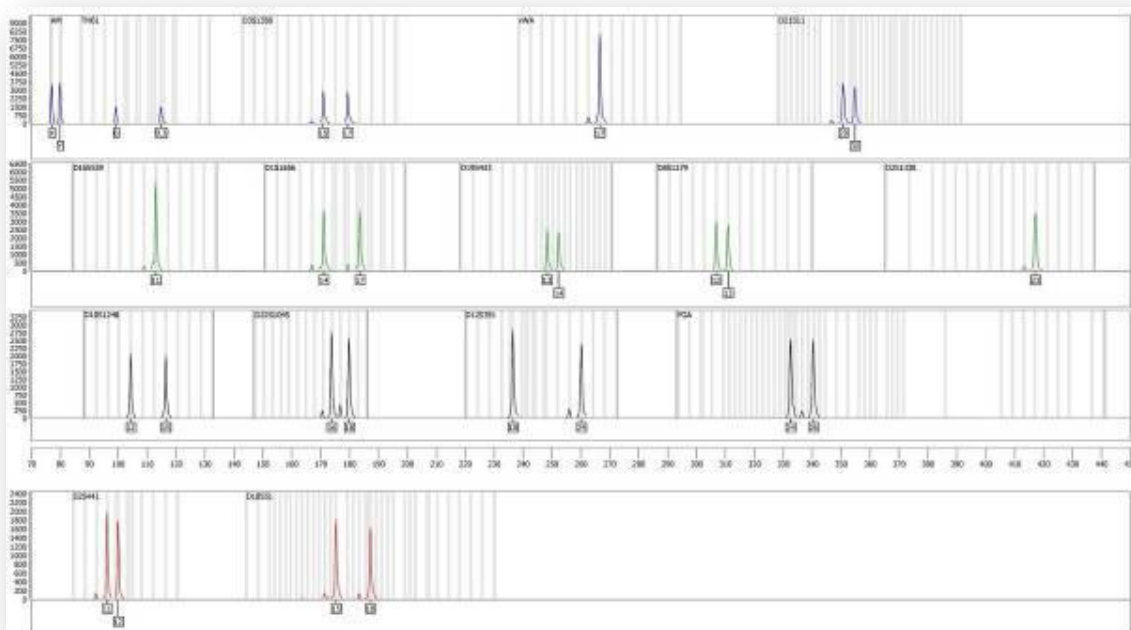


Figura 13 – Exemplo dos resultados obtido pelo teste *Investigator ESSplex Plus*<sup>®</sup> Kit (com 1ng de ADN).

## 11.4 Anexo IV

### a) Soluções controlo usadas nos diferentes testes <sup>25, 26, 27, 28, 29</sup>

<i>Locus STR</i>	<i>DNA XY13</i>
<b>Amelogenina</b>	X, Y
<b>D1S1656</b>	16, 17.3
<b>D2S441</b>	10, 11
<b>D2S1338</b>	17, 23
<b>D3S1358</b>	15, 16
<b>D8S1179</b>	13, 14
<b>D10S1248</b>	14, 15
<b>D12S391</b>	16, 18
<b>D16S539</b>	11, 12
<b>D18S51</b>	14, 15
<b>D19S433</b>	13, 14
<b>D21S11</b>	28.2, 33.2
<b>D22S1045</b>	17, 18
<b>FGA</b>	22, 23
<b>TH01</b>	6, 7
<b>vWA</b>	15, 16

<i>Locus STR</i>	<i>9947A</i>	<i>2800M</i>
<b>Amelogenina</b>	X, X	X, Y
<b>CSF1PO</b>	10, 12	12, 12
<b>FGA</b>	23, 24	20, 23
<b>Penta D</b>	12, 12	12, 13
<b>Penta E</b>	12, 13	7, 14
<b>TH01</b>	8, 9.3	6, 9.3
<b>TPOX</b>	8, 8	11, 11
<b>vWA</b>	17, 18	16, 19
<b>D3S1358</b>	14, 15	17, 18
<b>D5S818</b>	11, 11	12, 12
<b>D7S820</b>	10, 11	8, 11
<b>D8S1179</b>	13, 13	14, 15
<b>D13S317</b>	11, 11	9, 11
<b>D16S539</b>	11, 12	9, 13
<b>D18S51</b>	15, 19	16, 18
<b>D21S11</b>	30, 30	29, 31.2

Tabela 14 – Soluções controlo usadas pelos testes.