

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LAIANA SILVEIRA BELTRAMI

**IDENTIFICAÇÃO POR DNA DE AGRESSORES SEXUAIS NO RIO GRANDE DO SUL:
CARACTERIZAÇÃO DA MELHOR SISTEMÁTICA PARA OBTENÇÃO DE PERFIL
GENÉTICO AUTOSSÔMICO COM FINALIDADE DE CONFRONTO EM BANCO DE
DNA CRIMINAL.**

Porto Alegre
2015

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Laiana Silveira Beltrami

**IDENTIFICAÇÃO POR DNA DE AGRESSORES SEXUAIS NO RIO GRANDE DO SUL:
CARACTERIZAÇÃO DA MELHOR SISTEMÁTICA PARA OBTENÇÃO DE PERFIL
GENÉTICO AUTOSSÔMICO COM FINALIDADE DE CONFRONTO EM BANCO DE
DNA CRIMINAL.**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular da PUCRS como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Celular e Molecular.**

Orientadora: Dra. Clarice Sampaio Alho

Porto Alegre

2015

Ficha Catalográfica

B453i Beltrami, Laiana Silveira

Identificação por DNA de agressores sexuais no Rio Grande do Sul :
Caracterização da melhor sistemática para obtenção de perfil genético
autossômico com finalidade de confronto em banco de DNA criminal / Laiana
Silveira Beltrami . – 2015.

60.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Alho.

1. Agressão sexual. 2. Banco de DNA. 3. Extração Diferencial. I. Alho,
Clarice. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

Folha de Aprovação

Laiana Silveira Beltrami

Orientadora: Dra. Clarice Sampaio Alho

IDENTIFICAÇÃO POR DNA DE AGRESSORES SEXUAIS NO RIO GRANDE DO SUL:
CARACTERIZAÇÃO DA MELHOR SISTEMÁTICA PARA OBTENÇÃO DE PERFIL
GENÉTICO AUTOSSÔMICO COM FINALIDADE DE CONFRONTO EM BANCO DE
DNA CRIMINAL.

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular
e Molecular da PUCRS como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Marcelo Malaghini

Dra. Edna Sadayo Miazato Iwamura

Dr. Eduardo Eizirik

Aprovado em ____ de ____ de ____

Agradecimentos

À Professora Clarice Alho pela confiança e pelo incentivo no desenvolvimento do projeto e aos colegas da Divisão de Genética-Forense do Instituto-Geral de Perícias pelo auxílio na condução do estudo.

RESUMO

Os registros de vítimas femininas de estupro são altos no Brasil e no Rio Grande do Sul (RS), sendo que apenas na Divisão de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias-RS (DGF-IGP-RS) constam mais de 2000 análises de agressão sexual pendentes. Devido ao contato íntimo entre vítima e agressor, vestígios de DNA do agressor estão frequentemente disponíveis e podem ser usados para a identificação do criminoso. No Brasil, recentemente, foi instituído o Banco Nacional de Perfis Genéticos Brasileiro (BNPG), ferramenta muito útil para casos com ausência de suspeito, visto permitir o confronto entre perfis de DNA obtidos de materiais colhidos em locais de crime e de vítimas. Assim, visto a grande demanda represada, esse estudo buscou definir, através da análise de diversas características de casos de agressão sexual, as prioridades de exame para os casos pendentes, objetivando a obtenção de perfis autossômicos dos criminosos para inserção no BNPG. Para isso, avaliou-se a taxa de obtenção de DNA em 272 casos concluídos pela DGF-IGP-RS, relacionando com parâmetros como: idade da vítima, relação entre agressor e vítima, intervalo pós-coito, intervalo entre agressão e exame de DNA, testes para a presença de espermatozoides e sêmen, tipo de extração de DNA, dentre outros. Somando-se a isso, o DNA das amostras de 31 casos foi extraído, primeiramente, com o protocolo não diferencial (ND). Caso tenha sido obtido perfil de cromossomo Y e houvesse coleta em duplicata, o material foi extraído com a utilização do protocolo de extração diferencial (ED) padronizado pelo Federal Bureau of Investigation (FBI) e recomendado pela Secretaria Nacional de Segurança Pública brasileira. Materiais colhidos em triplicata foram submetidos a diferentes modos de incubação (n=16 amostras). Através da análise dos 272 casos concluídos, verificou-se uma taxa total de obtenção de perfil autossômico do agressor (mistura ou fonte única) em 17,3%, sendo que em mais de 90% dos casos foi utilizado um método ND. Durante a análise dos casos pendentes, com a utilização da ED, a taxa obtida foi de 32,26%, revelando uma maior eficiência da obtenção de perfis autossômicos para inserção no BNPG. Quanto à proposta de incubação modificada, não foi possível identificar um padrão na obtenção de DNA masculino, sendo necessários maiores estudos. A partir das informações dos 272 casos concluídos, traçou-se o perfil de caso mais provável de se obter perfil genético autossômico do agressor, sendo ele: intervalo pós-coito inferior a 24h (27,6% de obtenção de perfil autossômico), intervalo entre agressão e análise inferior a 2 anos, materiais positivos para espermatozoides ou antígeno prostático específico (PSA), dando-se prioridade de análise às vestes (41,6%) em relação aos swabs vaginais (28,1%). Além disso, verificou-se ser mais provável o comportamento reincidente em agressores desconhecidos (48,2%) do que conhecidos (14,3%), fato relevante ao considerar-se o objetivo do estudo de alimentar o BNPG. Devido à recente instituição do BNPG, não se tem conhecimento de estudo semelhante a este conduzido no Brasil, tornando o presente estudo um importante balizador para outras realidades de laboratórios forenses brasileiros.

Palavras-chave: Agressão sexual. Banco de DNA. Extração Diferencial.

Abstract

The numbers of female rape victims are high in Brazil and Rio Grande do Sul (RS). In Division of Forensic Genetics in General Institute of Forensics (DFG-GIF-RS) more than 2000 cases of sexual assault are awaiting analysis. Because of the close contact between victim and aggressor, DNA traces of the perpetrator are often available and can be used to identify the criminal. In Brazil, recently, the National Bank of Genetic Profiles (NBGP) was established, and became a very useful tool for cases with no suspect, as it allows the confrontation between DNA profiles obtained from material collected at crime scenes and victims. Thus, this study sought to define, through the analysis of various characteristics of sexual assault cases, priorities for our large DNA backlog, aiming to get autosomal profiles of criminals for insertion into NBGP. For this, we evaluated the rate of obtaining DNA in 272 closed cases by the DFG-IGP-RS, relating to parameters such as: victim's age, relationship between aggressor and victim, post-coital interval, interval between aggression and DNA tests, tests for the presence of sperm and semen, type of DNA extraction, among others. Adding to this, the DNA samples from 31 cases was extracted, first, with no differential protocol (ND). If was obtained Y chromosome profile at first sample and if samples were collected in duplicate, the evidence was extracted using the differential extraction protocol (ED) standardized by the FBI and recommended by the National Public Security Secretariat. Evidence collected in triplicate, were submitted to different types of incubation (n=16 samples). Through the analysis of 272 cases closed, the total rate of autosomal profile detection of the perpetrator (mixture or single source) was 17.3%, with 90% of cases extracted with ND method. During the analysis of pending cases with DE method, the rate was 32.26%, showing an increased efficiency of obtaining profiles for insertion into the NBGP. Regarding the modified incubation protocol, we could not identify a pattern in male DNA detection, requiring more studies. From the data collected from 272 closed cases, we define the most likely case profile to obtain autosomal genetic DNA of the aggressor: post-coital interval less than 24 hours (autosomal profile detected in 27.6%), time elapsed between aggression and analysis less than two years, evidence positive for spermatozoa or prostatic specific antigen, prioritizing the analysis of clothing (autosomal profile detected in 41.6%) compared to vaginal swabs (28.1%). In addition, it was found that recidivist behaviour is more likely among unknown perpetrators (48.2%) than known (14.3%). This fact is important when considering the purpose of our study of feeding the NBGP. Due to the recent establishment of NBGP, we do not know a similar study conducted in Brazil, making our study an important landmark for other realities of Brazilian forensic laboratories.

Keywords: Sexual assault. DNA databank. Differential extraction.

Lista de Tabelas

Capítulo II

Table 1 – DNA results from analysis of concluded cases.....	34
Table 2 – Relation between post-coital interval and obtained autosomal and Y-STR profiles.....	35
Table 3 – Relation between evidences characteristics and obtained autosomal and Y-STR profiles.....	35
Table 4 – Autosomal DNA profile for 18 samples extracted with differential and non-differential protocols.....	36
Table 5 - Autosomal DNA profile for 18 samples extracted with differential extraction according to the presence or absence of spermatozoa.....	37

Capítulo III

Tabela 1 – Comparação entre os protocolos diferenciais quanto à obtenção de perfil autossômico.....	46
---	----

Lista de Siglas

BNPG - Banco Nacional de Perfis Genéticos;

CODIS - *Combined DNA Index System*;

DGF-IGP-RS - Divisão de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias do Rio Grande do Sul;

FBI - Federal Bureau of Investigation;

DTT - Ditiotreitól;

PSA - Antígeno prostático específico;

RIBG - Rede integrada de Bancos de Perfis Genéticos;

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação;

SENASP – Secretaria Nacional de Segurança Pública;

SDS - dodecil sulfato de sódio;

STR - *Short tandem repeats*.

SUMÁRIO

Capítulo I.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 AGRESSÃO SEXUAL	10
1.1.1 Legislação.....	10
1.1.2 Vítimas	10
1.1.3 Local de ocorrência	11
1.1.4 Agressores	12
1.2 USO DO DNA NA IDENTIFICAÇÃO DE AGRESSORES SEXUAIS	13
1.3 COMPARAÇÃO ENTRE PERFIS GENÉTICOS E USO DO <i>SOFTWARE</i> CODIS ..	16
1.3.1 CODIS no Brasil.....	20
1.4 Extração de DNA espermático	22
1.5- INTERVALO PÓS-COITO	24
1.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESPERMATOZOIDES E TESTES PRESUNTIVOS PARA SÊMEN.....	26
1.7 ANÁLISES PENDENTES E PROCEDIMENTOS	27
1.8 ANÁLISE NA DIVISÃO DE GENÉTICA FORENSE DO IGP-RS.	28
1.9 JUSTIFICATIVA	29
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
Capítulo II Artigo científico submetido à revista International Journal of Legal Medicine ...	31
Capítulo III Estudo dos 31 casos pendentes analisados	43
1. ANÁLISE DOS CASOS PENDENTES	44
1.1 Origem dos casos.....	44
1.3 Dados coletados.....	44
1.4 Obtenção de DNA	45
1.5 Amplificação e genotipagem; Análise de marcadores STR	45
2. RESULTADOS	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXOS.....	58

Capítulo I

Introdução e Objetivos

1. INTRODUÇÃO

1.1 AGRESSÃO SEXUAL

1.1.1 Legislação

Segundo o Artigo 213 do Código Penal Brasileiro, alterado pela Lei 12.015 de 2009 (Brasil, 2009), se define estupro como “Constranger alguém, mediante violência ou grave ameaça, a ter conjunção carnal ou a praticar ou permitir que com ele se pratique outro ato libidinoso”, incluindo na tipificação não apenas a penetração pênis/vagina (conjunção carnal), como também qualquer outra conduta libidinoso, podendo ser vítima e autores tanto homens como mulheres, sem distinção. A pena para o crime pode variar de seis a 10 anos de reclusão, possuindo algumas qualificadoras:

§ 1º Se da conduta resulta lesão corporal de natureza grave ou se a vítima é menor de 18 (dezoito) ou maior de 14 (catorze) anos: Pena - reclusão, de oito a 12 anos.

§ 2º Se da conduta resulta morte: Pena - reclusão, de 12 a 30 anos.

Em relação ao tipo de ação penal dos crimes de estupro, no Artigo 225 da lei já mencionada, estipula-se a ação penal pública condicionada à representação nos casos de vítimas maiores de 18 anos, ou seja, é necessário que a vítima manifeste sua vontade para que seja dado segmento na ação penal. Apesar dessa regra permitir a privacidade da vítima, ao desistir da ação, muitos agressores permanecem impunes.

Ainda em relação à legislação, a Lei nº 8.072, de 1990, traz o crime de estupro no rol de crimes hediondos, que são aqueles taxados pelo legislador como os de maior reprovação social devido a seu alto potencial lesivo (Brasil, 1990).

1.1.2 Vítimas

Apesar de a nova legislação incluir vítimas masculinas no tipo penal, devido à natureza do crime, as mulheres continuam sendo as maiores vítimas desse tipo de crime e os homens continuam sendo os maiores autores. Em 2014, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, ocorreram 16.810 notificações de violência sexual a mulheres no Brasil. mostrando Nesse mesmo período, ocorreram 2.335 notificações referentes a vítimas do sexo masculino (SINAN/SVS/MS, 2013).

No Rio Grande do Sul, no último ano, 1.123 notificações de violência sexual contra

mulheres foram registradas. Da mesma forma que no Brasil, a grande maioria de notificações no Estado é referente a vítimas femininas, tendo sido registradas apenas 235 notificações de vítimas masculinas. É importante informar que todos esses números podem estar subestimados, visto que muitas vítimas deixam de fazer ocorrência por diversos motivos como o medo do agressor, vergonha, preservação da família ou da relação com o agressor, ceticismo em relação à polícia (Vargas, 2008). Vale ressaltar ainda, que em alguns casos após o registro dos crimes, é comum que as vítimas desistam de prosseguir com a ação criminal perpetuando a impunidade, principalmente naqueles casos em que o agressor é um sujeito conhecido da vítima (Vargas, 1999). Estima-se que aproximadamente 35% dos casos sejam arquivados por vontade da própria vítima (Vargas, 2008). Além disso, estima-se que algumas vítimas, após registro da ocorrência, não realizam posteriormente o exame pericial, prejudicando uma possível identificação genética do agressor (Amarijo *et al.*, 2014).

Apesar da realidade das subnotificações, acredita-se que as denúncias de estupro vêm aumentando nos últimos anos, possivelmente devido a uma série de políticas públicas de incentivo à denúncia e a ampliação da rede de serviços especializados de atendimento às vítimas (Braga *et al.*, 2014). Além da criação das Delegacias de Polícia especializadas no atendimento à mulher vítima, outras estruturas como casas-abrigo e centros de atendimento à mulher em situação de violência também contribuíram para dar visibilidade ao tema e para incentivar as denúncias (Souze e Adesse, 2005).

Quanto à idade das vítimas, estudos indicam que as mulheres jovens e as adolescentes são as maiores vítimas desse tipo de crime (Andrade *et al.*, 2001; Facuri *et al.*, 2013; Ferreira, 2000). Em estudo conduzido na cidade de Rio Grande, no Rio Grande do Sul, identificou-se que o crime de estupro praticado contra vítimas adultas é mais comum na faixa etária entre 20-29 anos (Amarijo *et al.*, 2014).

1.1.3 Local de ocorrência

Quanto ao local de ocorrência, estima-se que a maioria dos casos de agressão sexual ocorram durante o percurso do trabalho ou escola, durante atividades corriqueiras realizadas próximas à residência (Ferreira, 2010) ou até mesmo na própria residência da vítima (Amarijo *et al.*, 2014).

De forma contrária ao senso comum, que imagina que as ocorrências de estupro ocorrem em lugares ermos escuros, Sudário e colaboradores (2005), mostraram em seu estudo que a violência ocorre em diversas situações cotidianas de lazer ou locomoção: “Eu estava

com um amigo, vendo o pôr do sol. A gente já tava indo embora e eu vi os dois subindo num barranco”; “Eu tava saindo da empresa e fui abordada por um cidadão”.

1.1.4 Agressores

Estima-se que no Brasil e no Rio Grande do Sul, em aproximadamente 25% e 20% das ocorrências contra mulheres, respectivamente, o agressor é um indivíduo desconhecido da vítima (SINAN/SVS/MS, 2013). Em um estudo realizado na cidade de Campinas, estimou-se que em 33% dos casos de estupro, os agressores eram indivíduos desconhecidos da vítima e, de acordo com o autor, é comum que agressores desconhecidos não venham a ser posteriormente identificados, visto que há pouco investimento nas Delegacias de Polícia especializadas no atendimento a mulheres vítimas de violência sexual. Assim, com uma equipe pouco qualificada no seu quadro funcional e pouco aparelhada, a investigação dos casos envolvendo desconhecidos muitas vezes acaba arquivada sem solução (Vargas, 2008).

O fato da maioria dos crimes de estupro ser praticado por indivíduos conhecidos da vítima não é exclusividade brasileira. Em estudo conduzido a partir da análise de 1076 agressões sexuais, realizado em Denver, Estados Unidos, foi verificado que, dos casos em que foi possível a identificação do grau de relação entre vítima e agressor, 37,8% dos estupros haviam sido cometidos por agressores do convívio da vítima; em 23,6%, era um indivíduo que a vítima havia conhecido no dia do estupro e em 38,7% dos casos o indivíduo era um total desconhecido (Riggs *et al.*, 2000).

Outra característica dos agressores sexuais é a atuação serial de alguns, podendo o número de vítimas de um mesmo criminoso variar de duas a até dezenas de mulheres em alguns casos (Woodhams e Labuschagne, 2012). Os crimes em série costumam desafiar as forças policiais do mundo inteiro devido a sua difícil investigação, principalmente pelo fato de estudos indicarem que estupradores seriais tendem a abordar mais frequentemente vítimas femininas desconhecidas, dificultando a identificação do criminoso (LeBeau, 1987).

Entre os casos de estupros em série no Brasil, um deles foi notório e bastante divulgado pela mídia. As ocorrências foram registradas no estado de São Paulo e o criminoso ficou conhecido como “Maníaco do Parque”. Ao que tudo indica, Francisco de Assis Pereira, iniciou sua vida criminal praticando estupros, evoluindo posteriormente para estupros seguidos de morte. Pelo menos nove vítimas agredidas sexualmente pelo criminoso procuraram a Polícia à época do fato, mas visto que as mesmas não registaram boletins de ocorrência em uma mesma Delegacia, as informações não foram vinculadas e a atuação serial

do agressor não foi identificada. Ao todo, Francisco de Assis Pereira fez 11 vítimas fatais (Casoy *et al.*, 2010).

Outro caso de estupros em série ocorreu em Minas Gerais na cidade de Belo Horizonte. Iniciando sua vida no crime no início da década de 80, Ivan Marques de Oliveira, conhecido como “estuprador da zona sul”, cometeu uma série de mais de 50 estupros até ser preso pela última vez em 2002. Usando armas para ameaçar as vítimas, o criminoso levava às vítimas ao desespero para depois cometer o ato sexual (Prata, 2009).

1.2 USO DO DNA NA IDENTIFICAÇÃO DE AGRESSORES SEXUAIS

A análise de DNA tornou-se uma ferramenta importante e indispensável nas investigações forenses (Jobling e Gill, 2004) e a demanda vem aumentando por diversos fatores. Entre esses fatores, podemos citar sua notória capacidade de solucionar crimes, o aumento na análise de materiais provenientes de crimes contra a propriedade e os constantes avanços científicos (Ritter, 2013).

A técnica de identificação humana por DNA utilizada é a de PCR Multiplex com a amplificação de *loci* STRs (*short tandem repeats* ou microssatélites) (Jobling e Gill, 2004). STRs são regiões do DNA cujas unidades de repetição possuem de dois a sete pares de base de comprimento e a variabilidade entre indivíduos se dá através da diferença do número de repetições dessas sequências. Por exemplo, em um *locus* específico de um dos cromossomos, um indivíduo pode possuir cinco repetições (alelo 5) de uma sequência “AATG” no cromossomo herdado de seu pai e seis repetições (alelo 6) dessa mesma sequência no cromossomo herdado de sua mãe. Assim, representa-se o genótipo desse indivíduo para essa região específica como genótipo 5,6. Devido às suas características, os *loci* STRs autossômicos apresentam grande poder de discriminação e de sensibilidade, e podem ser utilizados em amostras contendo mistura de material genético (Jobling e Gill, 2004).

A fim de se permitir que perfis genéticos obtidos em diferentes laboratórios pudessem ser comparados entre si, inclusive através de comparação em bancos de DNA, o rol de marcadores STRs utilizados na obtenção de perfis genéticos foi padronizado. Em novembro de 1997, o Laboratório do *Federal Bureau of Investigation* (FBI) estabeleceu 13 marcadores STR autossômicos como ideais para identificar perfis genéticos. São eles: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, vWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 e D21S11 (Butler e Hill, 2012) (Ver figura 1).

Para manter o controle de qualidade, as análises genéticas costumam ser realizadas

com a utilização de kits comerciais de amplificação. Kits comerciais padronizados e validados como o Identifiler® (Life Technologies) e PowerPlex® 16 (Promega) permitem a identificação dos 13 marcadores STRs padronizados pelo FBI, do marcador sexual amelogenina, e outros dois marcadores adicionais, D2S1338 e D19S433 no kit Identifiler®, bem como Penta D e Penta E no kit PowerPlex® 16 (Butler e Hill, 2012).

Atualmente, foram desenvolvidos kits de amplificação multiplex que amplificam uma maior quantidade de *loci*, ampliando seu poder de discriminação. Um desses kits modernos é PowerPlex® Fusion (Promega), que permite a amplificação simultânea de 24 *loci*, combinando os *loci* CODIS, um rol europeu e os marcadores D2S1338, D19S433, Penta E, Penta D, além da amelogenina e de uma região específica de cromossomo Y. Estudos indicam que o uso desse kit apresenta ótimos resultados em comparação com os kits que possuem menos regiões, principalmente em casos difíceis com amostras degradadas (Turrina *et al.*, 2013). A empresa Life Technologies também possui a sua versão de kit com o número de *loci* estendido: GlobalFiler™ Express.

Outro tipo de marcador de DNA utilizado em casos forenses são os marcadores de cromossomo Y, específico de indivíduos do sexo masculino. Os marcadores de cromossomo Y representam marcadores de linhagem e são passados de geração a geração sem alterações, visto que mais de 95% do cromossomo Y não sofre recombinação. Assim, exceto por mutações randômicas, pais, filhos e irmãos de uma mesma linhagem paterna compartilham o mesmo perfil haplotípico de cromossomo Y (Butler, 2005b).

Devido às características de não-recombinação e de herança do cromossomo Y, existem algumas desvantagens na utilização desse tipo de marcador em casos forenses, como por exemplo: seu poder de discriminação relativamente menor quando comparado ao uso de STRs autossômicos e a impossibilidade de individualizar suspeitos dentro de uma família (Butler, 2005b). Entretanto, uma das vantagens da técnica se consiste na possibilidade de amplificação específica de DNA masculino de amostras que apresentam mistura de DNA feminino e masculino, como o caso de amostras provenientes de agressão sexual onde se tem células espermáticas e vaginais misturadas (Sinha *et al.*, 2003).

Da mesma forma que nos STR autossômicos, alguns marcadores Y-STR foram estabelecidos como sendo o haplótipo mínimo necessário para a identificação genética. São eles: DYS19, DYS385a/b, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393 (Butler, 2005). A fim de se aumentar o poder de discriminação desses marcadores, kits

comerciais como o AmpFISTRsYfiler™ (Life Technologies) adicionaram outros oito marcadores (DYS438, DYS439, DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, e GATA H4) (Mulero *et al.*, 2006). A tecnologia atual, com os kits PowerPlex® Y23 System (Promega) e Yfiler®Plus (Life Technologies) permite que um número maior de *loci* sejam amplificados em uma mesma reação, melhorando a capacidade de se obter perfis genéticos conclusivos principalmente em casos de agressão sexual. Com o uso do kit Yfiler®Plus, estudos descreveram a possibilidade de se obter perfis genéticos de cromossomo em até 9 dias depois da relação sexual com penetração vaginal (Ballantyne *et al.*, 2013).

Em relação aos casos de agressão sexual, a análise de DNA é ferramenta útil para identificação do agressor, visto que, pela natureza do crime, fluidos biológicos como sêmen, saliva e outras secreções podem ser colhidos do corpo da vítima, bem como de preservativos, lençóis, toalhas e roupas deixados no local do crime e, posteriormente, analisadas em laboratório (Peterson *et al.*, 2012).

No estudo de Gingras e colaboradores (2009), identificou-se que em aproximadamente 32% dos casos de agressão sexual, o perfil genético autossômico do suspeito pôde ser identificado em pelo menos uma das amostras corporais colhidas das vítimas (*swab* vaginal, *swab* anal, *swab* da pele, ou lavado oral) e em 16% dos casos, o perfil pôde ser identificado através da análise de outros materiais como, por exemplo, roupas e roupas de cama, totalizando em aproximadamente 50% a taxa de sucesso de obtenção de perfis genéticos. Já no estudo de Maia e colaboradores (2010), realizado em Brasília-DF, através da análise de 143 *swabs* vaginais contendo espermatozoides foi possível a obtenção de perfis genéticos autossômicos de agressores sexuais em todos os casos, sendo, aproximadamente 96% dos casos, perfis de origem masculina fonte única, ou seja, sem a presença de alelos do perfil da vítima.

A genotipagem de material biológico deixado em locais de crime não serve apenas para condenar verdadeiros culpados, mas também para libertar inocentes. Em 1992, foi criado nos Estados Unidos uma organização sem fins lucrativos, chamada *Innocence Project*, dedicada a libertar inocentes, utilizando como ferramenta a análise de DNA. Por meio da análise do banco de dados do *Innocence Project*, verificou-se que de 194 condenados que haviam sido inocentados pelo projeto, 91% havia sido condenado por estupro ou por estupro e homicídio (Hampikian *et al.*, 2011). Esses casos revelaram falhas no processo legal, evidenciando que 1) a identificação visual por parte de vítimas ou testemunhas é um indício

fraco; 2) que ocorrem erros de julgamento, e 3) que falsas confissões de fato ocorrem e que a análise de DNA pode ser, em muitos casos, a única evidência forte. Atualmente, mais de 300 indivíduos foram inocentados nos Estados Unidos pelo projeto, incluindo 20 homens que aguardavam no corredor da morte a sua sentença (Innocence Project, 2015).

O caso de Marvin Anderson, sentenciado a 210 anos de prisão nos Estados Unidos, revela a importância da análise de DNA em crimes que deixam vestígios biológicos passíveis de identificação genética. Em 1982, uma jovem americana foi estuprada por um indivíduo negro que durante o ato revelou à vítima ser marido de uma mulher branca. Marvin Anderson tornou-se suspeito do caso pelo fato de ser o único negro conhecido dos investigadores e foi submetido à identificação visual através de uma foto apresentada à vítima, onde apenas a sua foto era colorida e a dos demais preto & branco. Após a vítima reconhecê-lo, o suspeito foi submetido a um novo reconhecimento, dessa vez, pessoalmente. Novamente a vítima o reconheceu, levando Marvin a permanecer 15 anos na prisão, até que um exame de DNA provou a sua inocência (Innocence Project, 2015).

1.3 COMPARAÇÃO ENTRE PERFIS GENÉTICOS E USO DO *SOFTWARE* CODIS

Os perfis genéticos obtidos de amostras colhidas de vítimas de agressão sexual podem ser usados para comparação direta com o DNA de suspeitos específicos que tenham sido identificados durante a investigação e que tenham doado amostra para confronto (Roman *et al.*, 2008), ou podem ser usados para serem inseridos em um banco de DNA criminal e comparados com o perfil de criminosos condenados e/ou com os perfis de DNA obtidos em investigações de outros crimes. Essa inserção é particularmente importante em casos de suspeitos desconhecidos e naqueles casos de agressor serial (Burg *et al.*, 2011).

O banco de DNA criminal do FBI, CODIS (*Combined DNA Index System*), iniciou como um projeto piloto em 1990, nos Estados Unidos. Atualmente, mais de 70 laboratórios em mais de 40 países, incluindo o Brasil, utilizam o *software* CODIS na criação de bancos de perfis genéticos próprios.

Nos Estados Unidos, o banco atua em três diferentes níveis. Primeiramente, há o nível local, em que as cidades gestam suas inserções e fazem *uploads* dos perfis para o nível estadual. Num segundo nível, há os bancos estaduais, que recebem os perfis dos diferentes municípios e inserem perfis de condenados e/ou suspeitos de acordo com política própria que pode variar entre os estados membros. Contudo, para fazer *upload* dos arquivos contendo os

perfis genéticos para o banco nacional, apenas são encaminhados os perfis que estejam de acordo com a legislação federal. No último nível, se encontra o banco nacional que recebe os perfis gerados em todo o território desde que de acordo com a legislação federal vigente (Bonacorso, 2010).

Dessa forma, aos perfis genéticos obtidos das amostras analisadas, sejam elas colhidas em local de crime ou do corpo das vítimas com autoria desconhecida ou amostras de referência de indivíduos condenados ou suspeitos são comparadas entre si, tanto em nível local, quanto estadual ou nacional, permitindo que se identifique coincidências entre elas.

Como já mencionado, existe um perfil básico de STRs autossômicos padronizados para uso no CODIS. Esse perfil é composto por 13 *loci* STR (chamados de 13 *loci* CODIS - Figura 1).

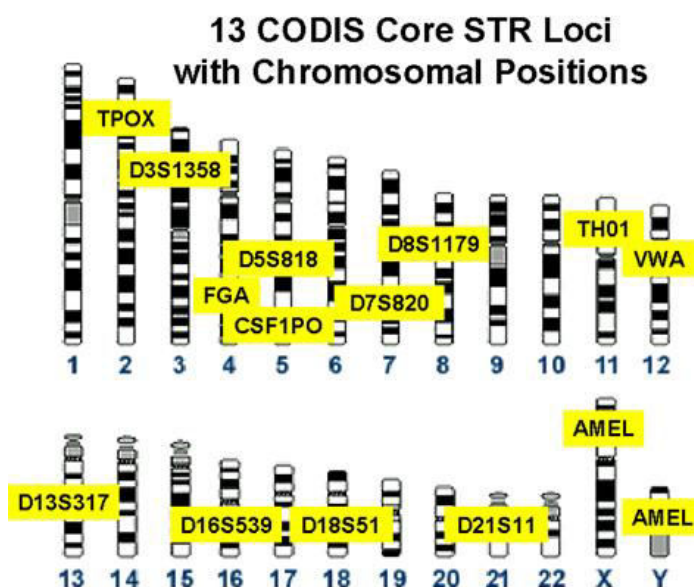


Figura 1 – Conjunto de *loci* STR padronizados para uso no CODIS

Fonte: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/fbicore.htm>

Uma comissão do FBI vem discutindo o aumento do número de *loci* passíveis de inserção no CODIS. Atualmente, caminha-se no sentido de ampliar o conjunto de *loci* para 20 marcadores, incluindo os originais, mais quatro marcadores europeus, o *loci* PentaE e um marcador de cromossomo Y (Ge *et al.*, 2012). Além dessa mudança, muito se questiona sobre a possibilidade da criação de bancos de DNA contendo perfis de cromossomo Y.

Ge e colaboradores (2014) descreve que a maioria dos perfis genéticos inseridos nos bancos de DNA são de indivíduos do sexo masculino (87% no Texas e 86% Guangdong – China) e cita como argumento positivo para uso de perfis haplotípicos de cromossomo Y bancos de DNA o fato desses perfis permitirem uma rápida exclusão de diversos potenciais suspeitos. Além disso, a inserção de perfis de cromossomo Y pode auxiliar na identificação de agressores sexuais em casos em que o perfil genético autossômico obtido contém mistura de material genético do agressor e da vítima (Ge et al., 2014).

Os bancos de DNA criminal são geridos por legislações específicas dos países e dos estados em que eles estão em funcionamento, assim, a política e o tipo de perfis que tem sua inserção permitida pode variar de acordo com o local. A maioria dos bancos de perfis genéticos dos países permite apenas a inserção de perfis genéticos fonte única, ou seja, que possua material genético de apenas um indivíduo. Em casos de agressão sexual, em que a presença de mistura de material genético da vítima e do agressor é comum, normalmente o perfil da vítima é ignorado durante a inserção. Alguns países permitem a inserção de perfis com mistura, mas limitam o número de *loci* contendo essa condição (Ge et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, além dos perfis provenientes de local de crime ou colhidos diretamente das vítimas, alguns países permitem a inserção de perfis de indivíduos presos e/ou condenados e a busca pode ser realizada intercruzando diferentes categorias, entre elas a de amostras de origem desconhecida colhidas em local de crime (*Forensic-Unknow*) e a de criminosos condenados (*Convicted Offender*), por exemplo (FBI, 2015).

As coincidências entre perfis são comumente identificadas como:

- ***Offender Hit***: Agressor identificado através da busca no CODIS a partir do DNA obtido de evidências.
- ***Forensic Hit (ou Case-to-Case Hit)***: Dois ou mais perfis obtidos de local de crime ou colhido de vítimas que possuem a mesma origem coincidente. O agressor pode ser conhecido em um dos casos ou ser desconhecido.
- ***Warm Hit***: Indivíduo cujo DNA é coincidente com o DNA da evidência e que já havia sido identificado como suspeito durante investigação policial.
- ***Conviction Match***: Indivíduo cujo DNA é coincidente com o DNA da evidência e cujo caso já foi solucionado.
- ***Benchmark Match***: Associação de casos identificada através de revisão prévia à

inserção no CODIS pelos analistas do laboratório (Gabriel *et al.*, 2010).

A utilização de bancos de DNA criminal sofrem diversas críticas referentes ao risco da falta de privacidade, à suposta vigilância governamental e às revelações quanto a um viés racial (Simoncelli e Wallace, 2006). A inserção de perfis de cromossomo Y no CODIS, por exemplo, é criticada por trazer um viés sexual nas buscas, ou seja, o início das inserções de perfis haplotípicos tornaria mais provável uma coincidência entre perfis masculinos, mas não afetaria as chances nos perfis femininos.

Assim sendo, para controle, os perfis genéticos inseridos no CODIS passam por uma rigorosa seleção. Primeiramente deve haver uma convicção razoável de que o material analisado pode conter de fato material biológico do agressor. Além disso, perfis genéticos obtidos de objetos apreendidos com o próprio suspeito, no seu carro ou no seu apartamento têm a sua inserção proibida como forma de garantia à privacidade do indivíduo (Solomon *et al.*, 2011).

Contudo, aspectos éticos e jurídicos quanto ao uso do *software* permanecem sendo discutidos. Para Schiochet e colaboradores (2012) as tecnologias genéticas geram discussão sob diversos aspectos, incluindo temas como privacidade, confidencialidade, proteção das identidades, garantia de não-discriminação, pesquisa e avanço da ciência, livre circulação de bens, coleta e armazenamento de material genético, acesso e uso de informação genética, credibilidade e licitude da informação coletada e analisada, salvaguarda da cadeia de custódia, biobancos, universalidade de acesso a tais tecnologias etc.

A despeito das críticas, os números mostram a importância dos bancos de DNA no combate ao crime. Desde a sua criação até junho de 2013, o CODIS americano revelou mais de 274.001 coincidências de perfis genéticos, auxiliando em mais de 261.501 investigações (FBI, 2015).

Corroborando a sua importância, através de análise das coincidências de perfis genéticos obtidas por uso do *software* entre os anos de 2001 e 2006, na Unidade de Biologia Forense do Departamento de Polícia de São Francisco, verificou-se 110 coincidências em casos de estupro nas categorias *Case-to-case* e *Offender hit*. Desses 110 casos, em um terço, o agressor não havia sido identificado pelas vias tradicionais de investigação policial (Gabriel *et al.*, 2010).

1.3.1 CODIS no Brasil

No ano de 2009, foi assinado um acordo entre a Polícia Federal brasileira e o FBI para

o uso do CODIS no Brasil e a instalação do *software* se deu em quinze estados, além do banco da Polícia Federal e do Nacional. Nesse mesmo ano foi criada a Rede integrada de Bancos de Perfis Genéticos (RIBG) tendo como membros especialistas da área de genética forense dos estados participantes. Atualmente, conforme o Ministério da Justiça, dezoito estados brasileiros possuem bancos de DNA, além da Polícia Federal, são eles: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Ceará, Bahia, Paraíba, Amapá, Amazonas, Pará, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Em 2014, se uniram à rede também o Distrito Federal, Goiás e Pernambuco (Godinho, 2014). Apesar de desde 2009 a RIBG estar formada, apenas em 2012 a legislação brasileira regulamentou o uso dos bancos e instituiu oficialmente o Banco Nacional de Perfis Genéticos (BNPG).

Através da Lei nº 12.654 de 28/05/2012 (Brasil, 2012), que alterou a Lei de Identificação Criminal (Brasil, 2009b) e a Lei de Execução Penal (Brasil, 1984), a identificação genética foi autorizada, tornando possível a coleta de material genético para fins de identificação criminal e obrigatória a identificação genética de condenados por crime praticado dolosamente, com violência de natureza grave contra pessoa, ou por crimes hediondos (Brasil, 1990). Além disso, a Lei nº 12.654 regulamentou as características principais do Banco, dentre elas o caráter sigiloso e a garantia da inserção de dados genéticos que não revelem traços somáticos ou comportamentais, exceto determinação genética de gênero.

Ainda no que tange a legislação do banco de DNA criminal no Brasil, através do Decreto nº 7.950, de 12/03/2013 (Brasil, 2013), foi instituído o BNPG e a RIBG, que, segundo o decreto, tem como objetivo armazenar, compartilhar e comparar dados de perfis genéticos, coletados no território nacional para subsidiar ações destinadas à apuração de crimes.

Apesar do início das inserções de perfis genéticos no BNPG ser recente no Brasil, já se obteve resultados promissores, revelando coincidência entre três materiais biológicos deixados em locais de crimes de estupro. Em um dos casos, o agressor alegou ter ocorrido sexo consensual com a vítima que prestou queixas e doou amostra para confronto genético que mostrou compatibilidade. Em um segundo caso de estupro, a investigação não chegou a identificar um suspeito provável, mas o material colhido da vítima foi processado e seu perfil inserido no BNPG. O terceiro caso, o mais emblemático da importância dos bancos de DNA, foi um caso de roubo seguido de estupro, no qual a vítima identificou um suspeito que foi

encaminhado para confronto de DNA com uma mancha de sangue colhida do local em que ocorreu o crime. O Laudo liberado pela Divisão de Genética Forense do Instituto Geral de Perícias-RS (DGF-IGP-RS) indicou que aquele sangue não pertencia àquele suspeito. Contudo, o suspeito I.O.P foi condenado pelo crime com base no depoimento da vítima e na leitura equivocada do Laudo de DNA.

Após o registro do *match* entre os três casos, foi emitido novo Laudo indicando que o sangue colhido da parede e da cama eram compatíveis com o material dos outros casos analisados. Disso, seguiu-se uma ação de revisão criminal para revogar a prisão de I.O.P. Contudo, até o presente momento, como se depreende do acórdão da ação, I.O.P permanece preso.

AÇÃO DE REVISÃO CRIMINAL. No caso, a condenação definitiva que o requerente pretende revisar deu-se nas sanções do art. 213, caput, em concurso material com o art. 157, caput, todos do C.P.B. Considerando que o requerente objetiva a rediscussão das questões já enfrentadas e decididas nos julgados revisandos, mostra-se inadequado e vulnera o princípio da democracia judiciária o manejo de ação de revisão criminal para pleitear a sua absolvição. No caso, a condenação do requerente I.O.P. decorreu de farta prova conjuntural produzida no caderno processual, com substantiva importância no indubitável aponte incriminatório feito pela jovem abusada por ele, razão pela qual não procede a presente ação de revisão criminal. AÇÃO DE REVISÃO CRIMINAL IMPROCEDENTE¹.

Uma segunda coincidência ocorreu entre dois casos de agressão sexual nas cidades de Alvorada e Viamão. Contudo, nesses casos o agressor até o presente momento não foi identificado pela investigação policial.

Mesmo apresentando resultados com tão pouco tempo de funcionamento, existe, ainda, o questionamento social quanto à relevância que o BNPG pode significar para o Brasil (Schicchet *et al.*, 2012). Por este motivo, a descrição e a análise técnica do grau de sucesso no uso desta ferramenta representa, acima de tudo, uma necessidade nacional.

1 Revisão Criminal Nº 70049748627, Terceiro Grupo de Câmaras Criminais, Tribunal de Justiça do RS, Relator: Aymoré Roque Pottes de Mello, Julgado em 16/08/2013).

1.4 EXTRAÇÃO DE DNA ESPERMÁTICO

Em estudo realizado na cidade de Caxias do Sul-RS, através da análise do prontuário de atendimento de 243 vítimas de agressão sexual, identificou-se a penetração vaginal como sendo a conduta mais recorrente por parte dos agressores, estando presente em 69,1% dos casos em associação ou não com outras condutas como penetração anal ou oral (Madi *et al.*, 2010). Esse resultado gaúcho é semelhante ao encontrado nos estudos sueco (Corovic *et al.*, 2012) e americano (Peterson *et al.*, 2012), nos quais se evidenciou penetração vaginal em aproximadamente 65% e 75% dos casos, respectivamente. Outro estudo conduzido nos Estados Unidos, também evidenciou a penetração vaginal como o comportamento mais comum, ocorrendo em 83,2% dos casos (Riggs *et al.*, 2000)

Amostras vaginais colhidas de vítimas de agressão sexual frequentemente apresentam grande quantidade de células epiteliais femininas em relação à quantidade de células espermáticas, o que pode mascarar o perfil genético do contribuinte masculino (Gill e Jeffreys, 1985). Muitos *swabs* vaginais apresentam proporção de DNA masculino:feminino menores que 1:100, sendo que esse valor tende a diminuir com o passar do tempo entre a agressão e a coleta (Garvin *et al.*, 2009). Estima-se que a proporção necessária entre DNA humano total/DNA de cromossomo Y para se obter perfil genético masculino completo é de 10 (Laberke *et al.*, 2012). Por isso, esforços devem ser feitos para se obter sucesso com quantidades menores de material do agressor.

Outro fator que contribui para a diminuição na proporção de DNA masculino:feminino foi identificado (Peterson *et al.*, 2012). Nesse estudo verificou-se que 80% das vítimas realizam algum tipo de higiene íntima após a ocorrência da agressão e que 46% troca de roupas antes do exame médico, situações que prejudicam a identificação do perfil genético masculino ao diminuírem a quantidade de material do agressor. Assim, a obtenção de perfis genéticos masculinos autossômicos é um dos maiores desafios encontrados pelos laboratórios forenses.

Na tentativa de contornar e melhorar as análises, Gill e colaboradores (1985) padronizaram uma extração de DNA baseando-se na diferença da estrutura da membrana celular de células epiteliais e de células espermáticas. Nesse protocolo um primeiro tampão de lise composto de detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e proteinase K, digere preferencialmente as células epiteliais, permanecendo os espermatozoides intactos. Após centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA feminino é separado e o *pellet* de

espermatozoides formado é submetido a um segundo tampão de lise contendo SDS, proteinase K e ditioneitol (DTT) (Gill *et al.*, 1985).

Porém, em alguns casos, a extração diferencial não é eficaz na separação dos tipos celulares. Visto que a relação entre células epiteliais e espermatozoides pode muitas vezes ser muito grande, um número considerável de células epiteliais pode permanecer na fração espermática, interferindo na obtenção do perfil genético masculino puro (Yoshida *et al.*, 1995). Além disso, principalmente em amostras colhidas com um intervalo pós-coito mais longo, a fragilidade da membrana dos espermatozoides pode causar uma lise prematura durante o passo da lise de células epiteliais mesmo na ausência de DTT (Ballantyne, 2013). Dessa forma, a separação dos tipos celulares e posterior genotipagem fica comprometida. Outro fator importante é a perda de DNA que ocorre durante a extração diferencial. Comparada à extração não-diferencial de DNA, as perdas chegam a 64% do DNA feminino na fração não-espermática e de até 98% do DNA masculino na fração espermática (Vuichard *et al.*, 2011).

Assim, modificações no protocolo original foram testadas ao longo do tempo a fim de se melhorar a extração diferencial. Yoshida e colaboradores (1995), por exemplo, sugeriram a adição de passo de lavagem entre as fases de lise, a fim de se retirar o máximo possível de DNA proveniente de células epiteliais antes da lise dos espermatozoides.

Além da perda de DNA masculino que pode ocorrer devido à manipulação durante as etapas de extração diferencial, outro viés dos protocolos tradicionais é o tempo de extração que pode durar até dois dias. O kit comercial DifferexTM (Promega), de forma semelhante aos métodos supracitados, também baseia-se na utilização de um tampão de digestão contendo proteinase K com subsequente separação dos espermatozoides por centrifugação, mas permite que o processo ocorra em aproximadamente duas horas. Além disso, este kit comercial permite automatizar algumas etapas, o que traz velocidade ao método (Tsukada *et al.*, 2006; Olson e Cowan, 2007; Valgren e Edenberger, 2008).

De forma diversa ao protocolo DifferexTM, que foca na separação física através de centrifugação, o protocolo proposto por Garvin e colaboradores se baseia na degradação seletiva do DNA. Após o DNA das células epiteliais ser liberado através da lise com proteinase K, a adição da enzima DNase I degrada seletivamente o DNA solubilizado e não age no material genético dos espermatozoides intactos (Garvin *et al.*, 2009). Esse último protocolo possui a mesma vantagem do DifferexTM ao proporcionar a possibilidade de

automação, mas com a vantagem de não necessitar de etapa de centrifugação. Além disso, os resultados apresentados por essa extração são superiores aos obtidos pelo Differex™ (Garvin *et al.*, 2009; Garvin *et al.*, 2012). Contudo, Carson e colaboradores (2013) após diversas análises do protocolo de degradação seletiva, concluíram que a concentração utilizada no protocolo original publicado (0,9U/μL) era insuficiente para gerar perfis genéticos masculinos fonte única, sem contaminação com o DNA da própria vítima em diversos casos. Após diversos testes, os autores concluíram que a concentração ótima para eliminar praticamente todo ou todo o DNA epitelial era de 6,4 U/μL.

Baseando-se na mesma premissa de separação entre células epiteliais e espermatozoides já mencionada, o FBI também padronizou um método de extração diferencial que vem sendo recomendado como protocolo padrão para casos de agressão sexual pela Secretaria Nacional de Segurança Pública brasileira (FBI, 1999, *apud* Brasil, 2013b). Com a utilização do detergente Sarkosil no tampão de extração e com a adição de três etapas de lavagem do *pellet* de espermatozoides formado, o protocolo mostra-se bastante eficiente no isolamento do perfil genético masculino, com o propósito da inserção dos perfis obtidos em banco de DNA criminal. Utilizando a extração mencionada, um estudo brasileiro, conduzido no Distrito Federal, cujo objetivo específico se configurava como a obtenção de perfis genéticos masculinos autossômicos para inserção em bancos de DNA, obteve em quase a totalidade dos casos perfis masculinos (Maia, 2010).

A extração de DNA supracita foi padronizada para uso na DGF-IGP-RS e vem apresentando resultados bons com a incubação indicada (37°C por 2 horas). Contudo, muitos casos positivos para a presença de espermatozoides continuam apresentando mistura de material genético da vítima e do agressor na fração espermática, sendo essa situação desfavorável para o uso posterior dos perfis em bancos de DNA criminal (dados não publicados). Visto que o tempo e a temperatura de incubação da extração orgânica direta é de 56°C *overnight* e essa extração é tida com uma das mais eficientes (Barbaro, *et al.*, 2004; Köchl *et al.*, 2005) permanece a dúvida sobre o que seria mais adequado no universo de amostras analisadas pela Divisão: uma incubação mais branda que minimiza as perdas de espermatozoides porventura degradados ou uma incubação mais longa que permite que uma maior quantidade de células femininas se degradem durante a lise das células epiteliais.

1.5- INTERVALO PÓS-COITO

Estudos indicam que o intervalo de tempo entre a agressão sexual e a coleta de

material para análise genética (intervalo pós-coito) é crítico para a obtenção de DNA do agressor, visto que, com o passar do tempo, os espermatozoides se tornam fragilizados e menos frequentes. Assim, a possibilidade de perda de espermatozoides presentes nas amostras devido à manipulação necessária para a extração diferencial torna-se uma desvantagem inerente à técnica (Ballantyne, 2013).

Foi identificado que o intervalo médio de tempo entre a agressão e a coleta é de 23,30 horas, sendo que vítimas agredidas por indivíduos desconhecidos apresentaram uma média inferior (18,15 horas) em relação às vítimas que conheciam o seu agressor (25,63 horas) (Peterson *et al.*, 2012). Porém, estudos indicam que em alguns casos a procura médica ocorre após as 72 horas. Em estudo desenvolvido em Caxias do Sul-RS, observou-se que em quase metade dos casos o tempo transcorrido entre a violência e o atendimento da vítima foi superior a 24 horas, sendo que em 11,1 % dos casos, o atendimento ocorreu após decorridas 72 horas (Madi *et al.*, 2010).

No estudo de Gingras e colaboradores (2009) identificou-se obtenção de DNA autossômico em apenas 8% dos *swabs* colhidos após 72 horas da agressão, contra a obtenção em 35% dos *swabs* colhidos nas primeiras 24 horas após o crime. Corroborando esse resultado, através da utilização de extração diferencial, verificou-se que amostras colhidas 24 horas ou mais depois do coito costumam falhar na obtenção de perfil autossômico masculino (Hall e Ballantyne, 2003). Em outro trabalho, a partir da análise de *swabs* vaginais colhidos entre 60 e 96 horas após o coito, não foi possível isolar completamente o perfil masculino autossômico com a utilização de extração diferencial em nenhuma das amostras testadas, obtendo-se mistura em todos os períodos avaliados. Nesse estudo, foi utilizado um passo único de lavagem entre as duas lises para evitar maiores perdas de células espermáticas (Ballantyne, 2013).

Muitas vezes a obtenção de uma mistura de DNA de vítima e agressor é suficientemente clara para, a partir da comparação direta com o perfil genético do suspeito e da vítima, permitir a exclusão ou a não-exclusão desse indivíduo como contribuinte da mistura obtida (Butler, 2005a). Contudo, com o advento do CODIS, que permite a identificação de agressores desconhecidos através da comparação entre amostras colhidas de diferentes vítimas, é necessário um aprimoramento no isolamento do DNA do agressor considerando o tempo transcorrido entre a agressão e a coleta.

1.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA DE ESPERMATOZOIDES E TESTES

PRESUNTIVOS PARA SÊMEN

A análise microscópica de lâminas contendo esfregaço vaginal para identificação de espermatozoides e a identificação de proteínas presentes no sêmen vêm sendo usada ao longo do tempo como forma de comprovar o ato sexual entre suspeito e vítima. Em estudo conduzido por Riggs e colaboradores (2000), foi verificado que em 48,3% dos *swabs* vaginais, anais, orais ou de pele foi possível a identificação de espermatozoides ou a presença da proteína fosfatase ácida, indicativa da presença de sêmen.

Contudo, resultados negativos nessa análise não implicam a não obtenção de perfil genético passível de comparação com os suspeitos, especialmente em situações de oligo ou azoospermia (Shewale *et al.*, 2003).

Através da análise de DNA de lâminas contendo material vaginal, negativas para a presença de espermatozoides em análise microscópica, Olofsson e colaboradores (2011), identificaram que em 29% dos casos foi possível a obtenção de perfil genético de cromossomo Y completo ou parcial. Os autores concluíram que esse perfil obtido pode ser proveniente de células epiteliais e de leucócitos do indivíduo do sexo masculino, mas também de espermatozoides não encontrados durante o exame microscópico por, por exemplo, erro de amostragem.

De forma semelhante, a utilização de testes imunocromatográficos que identificam marcadores seminais, como a proteína semenogelina e o antígeno prostático específico (PSA), também falham em prever a obtenção de perfis genéticos masculinos. Em estudo, foi possível verificar que mais da metade das amostras negativas para semenogelina e PSA resultaram em genotipagem de perfil autossômico completo ou parcial do indivíduo agressor do sexo masculino através de extração diferencial (Benschop *et al.*, 2010).

A ausência de outro marcador da presença de sêmen, a fosfatase ácida, também não indica a não-obtenção de perfil genético masculino. A partir da análise de materiais negativos para a presença desse marcador, obteve-se perfil genético autossômico dos suspeitos em 14% dos casos (Gingras *et al.*, 2009).

Dessa forma, visto que é possível identificar-se perfil genético masculino em materiais cujos resultados para a presença de espermatozoides e de sêmen são negativos, torna-se necessário estabelecer qual metodologia de extração de DNA é a mais adequada para esses casos com o intuito de obter-se perfil genético autossômico do suspeito.

1.7 ANÁLISES PENDENTES E PROCEDIMENTOS

Laboratórios de DNA frequentemente possuem grandes quantidades de casos de agressão sexual ainda não testados, o que pode atrasar a conclusão de processos judiciais e permitir que agressores façam novas vítimas. O número de casos pendentes não é um número estático e varia conforme a capacidade de análise dos Laboratórios. Já a capacidade de análise dos Laboratórios, por sua vez, varia conforme a padronização de novos processos, o recebimento de novos equipamentos, a contratação ou perda de analistas treinados e a demanda de requisições. Em documento publicado pelo Departamento de Justiça Americano, verificou-se que, apesar do aumento da capacidade de análise por parte dos Laboratórios Criminais dos Estados Unidos, o número de análises pendentes no país está aumentando, visto que o aumento na demanda ultrapassa as melhorias na capacidade de processamento (Nelson, 2011).

Em outro documento do Departamento de Justiça Americano, específico sobre estoque de casos de agressão sexual, se discute acerca das possibilidades de se priorizar alguns casos baseados em suas características em detrimento de outros, levando em conta justiça, segurança pública e necessidades das vítimas (Ritter, 2011). Visto que a análise de todos os casos pendentes esgotaria os recursos financeiros e de pessoal, alguns Estados americanos criaram regras para analisar os casos ainda não analisados. Em Dallas, por exemplo, estipulou-se que apenas casos abertos de suspeitos desconhecidos à vítima seriam analisados. Em Los Angeles, a prioridade foi dada também aos casos de agressor desconhecido, mas também àqueles cometidos por indivíduos com posição de autoridade. Já Detroit, optou por selecionar randomicamente os casos. Outros estudos reforçam a prioridade aos casos de agressores desconhecidos, visto que a análise de DNA dos casos de agressores conhecidos, como cônjuges, por exemplo, não seria útil quando o suspeito não nega ter mantido relação sexual (Nelson, 2013). Contudo, apesar das diferentes abordagens, ainda são necessários dados científicos para apontar qual é o sistema mais eficiente na resolução de crimes (Ritter, 2011).

Através da análise de 1.948 casos de agressão sexual pendentes de Los Angeles, verificou-se que as técnicas sorológicas de triagem e a amplificação de cromossomo Y apresentaram resultados semelhantes em relação à possibilidade de gerar perfis genéticos autossômicos. Entretanto, a amplificação do cromossomo Y apresentou resultados superiores em amostras vaginais e de secreções secas. A amplificação do cromossomo Y mostrou-se

também superior em relação ao teste sorológico naqueles casos em que as amostras foram colhidas após 24 horas da agressão (Peterson *et al.*, 2012). Nesse mesmo estudo, a taxa de sucesso de obtenção de perfil autossômico e de inserção de perfis no CODIS foi de 17,8%, e em 49,6% desses casos houve coincidências entre perfis. Dentro da categoria *Offender hit*, supõe-se que 64% das coincidências ocorreram pois o suspeito era conhecido da vítima e o seu DNA já havia sido inserido no CODIS previamente. Em 30% das coincidências dessa mesma categoria o agressor era um indivíduo desconhecido, e em 6% a relação entre vítima e agressor não era conhecida.

Apenas 7,8% das coincidências se enquadraram na categoria *Case-to-case* e, em 74% dessas coincidências, o caso estava relacionado a outro cujo agressor já havia sido identificado. Isso pode ser explicado pelo fato do intervalo de tempo decorrido entre a agressão e a inserção no CODIS ser longo e aumentar a possibilidade de o agressor ter tido seu perfil de DNA inserido no CODIS devido a outros crimes, ou pelo fato de ele ter sido relacionado a algum crime revelado em uma investigação policial tradicional.

1.8 ANÁLISE NA DIVISÃO DE GENÉTICA FORENSE DO IGP-RS.

A DGF-IGP-RS atende a demanda de análises de DNA criminal dos 497 municípios do Estado do Rio Grande do Sul. Atualmente, devido ao grande número de análises de agressão sexual pendentes na Divisão (2.215 requisições), por regra geral, dá-se prioridade de análise àqueles casos em que se tenha além da amostra questionada (*swab* vaginal, *swab* anal, vestes, etc.), a amostra de referência da vítima (sangue periférico ou *swab* oral) e a amostra de referência do suspeito da agressão para confronto direto. Assim, os casos em que não se tenha um suspeito identificado permanecem aguardando análise, sendo as amostras preservadas sob refrigeração. Casos em que são recebidas apenas amostras questionadas, com ausência de referências, são suspensos até que essa ausência seja sanada.

Em relação à pesquisa microscópica de espermatozoides, grande parte das vestes e dos materiais colhidos das vítimas são submetidos a essa análise no Departamento Médico-Legal (DML) do IGP-RS, e, independentemente do resultado, o material é encaminhado à DGF-IGP-RS para análise de DNA. Assim como consta da literatura, em alguns casos analisados pela Divisão em que o resultado da pesquisa de espermatozoides foi negativo, foi possível a obtenção de perfis genéticos de cromossomo Y, bem como perfis de mistura de DNA autossômico (dados não publicados). De forma semelhante, a pesquisa de PSA, também

apresentou divergências entre os resultados imunológicos e a obtenção de perfil genético.

No que tange a diversidade de amostras recebidas pela DGF-IGP-RS, apesar dos esforços para padronização do atendimento às vítimas de agressão sexual (Brasil, 2013b), as amostras encaminhadas à DGF-IGP-RS ainda não obedecem a um padrão. Atualmente, das 2.215 requisições registradas, 1.176 se encontram suspensas, tendo como um dos motivos principais o não encaminhamento de amostra de referência da própria vítima. O encaminhamento de um número inadequado de *swabs* contendo amostras questionadas também se torna um desafio para o sucesso das análises. Visto que muitas vezes as amostras disponíveis para a análise são exíguas (por exemplo, *swab* vaginal único), e visto que, segundo a literatura, a extração de DNA diferencial acarreta perda significativa de material genético masculino (Vuichard *et al.*, 2011), a DGF-IGP-RS prioriza, a extração orgânica direta (FBI, 1994) com o objetivo de se obter, pelo menos, um perfil genético de cromossomo Y passível de comparação com suspeitos. Apesar das desvantagens relativas à análise de cromossomo Y (Butler, 2005b), a obtenção de perfil haplotípico de cromossomo Y pode ser satisfatória quando há a disponibilidade de amostra de referência de suspeitos conhecidos para comparação direta. Contudo, devido a instituição do BNPG, a obtenção de perfis genéticos autossômicos é primordial para o sucesso dos confrontos.

Assim, iniciou-se o uso na DGF-IGP-RS da extração diferencial padronizada pelo FBI e recomendada pela Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP) (FBI, 1999 *apud* Brasil, 2013) como padrão para casos de agressão sexual. Contudo, visto que seguidamente os materiais analisados, mesmo os positivos para a presença de espermatozoides, apresentam mistura de material genético na fração espermática, torna-se necessário a avaliação do uso da extração.

1.9 JUSTIFICATIVA

Considerando a recente criação do BNPG, o processo de extração diferencial de DNA se torna uma ferramenta importante para a identificação de agressores sexuais seriais. Contudo, visto que a demanda de casos pendentes na DGF-IGP-RS é grande, primeiramente, torna-se necessário o conhecimento acerca do universo de amostras recebidas na DGF-IGP-RS para se estabelecer prioridades. Além disso, o protocolo de extração diferencial recentemente padronizado para uso pela DGF-IGP-RS (FBI, 1999 *apud* Brasil, 2013c), recomendado pela SENASP, apesar de apresentar bons resultados, revela a impossibilidade da

separação completa do DNA masculino na fração espermática em algumas amostras. Assim, a viabilidade da modificação do protocolo, com objetivo de aprimorá-lo de acordo com o universo de amostras trabalhadas, deve ser avaliada. Por fim, as inserções dos perfis genéticos masculinos no BNPG e as eventuais coincidências reveladas pelo *software* CODIS no futuro, irão permitir que se pondere sobre o avanço que a Lei 12.654/12 e o Decreto nº 7950/2013 representam para a federação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer metodologia de análise para casos de agressão sexual pendentes na DGF-IGP-RS, com objetivo de obtenção de perfil genético autossômico do criminoso, considerando a diversidade das amostras recebidas e a posterior comparação em banco de DNA criminal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características e resultados laboratoriais obtidos dos materiais colhidos de vítimas de agressão sexual no triênio 2010-2011-2012 analisados na DGF-IGP-RS.
- Comparar a eficiência na obtenção de perfil genético do agressor em relação ao resultado da pesquisa de espermatozoides.
- Comparar a eficiência na obtenção de perfil genético do agressor em relação ao resultado dos testes imunológicos indicativos da presença de sêmen.
- Comparar a eficiência na obtenção de perfil genético do agressor em relação ao intervalo pós-coito.
- Comparar a eficiência na obtenção de perfil genético do agressor, oriundo de amostras colhidas da vítima, pelo uso da técnica de extração de DNA orgânica diferencial recomendada pela SENASP, com diferentes incubações da fração não-espermática.
- Analisar comparativamente a taxa global de sucesso da sistemática de trabalho proposta no presente estudo em relação aos resultados prévios referentes ao triênio 2010-2011-2012 no Rio Grande do Sul no que se refere à obtenção de perfis autossômicos do agressor.

Artigo científico submetido à revista International Journal of Legal Medicine

Fator de impacto: 2,597

Title:

DEFINING PRIORITIES TO REDUCE SEXUAL ASSAULT BACKLOG WITH FOCUS ON FEEDING DNA DATABASES.

Authors:

Laiana Silveira Beltrami¹, Gustavo Lucena Kortmann¹, Aline Spindler¹, Ana Paula Magalhães Lebouté¹, Mara Regina Netto Benetti¹, Polyana Sartori Maier¹, Rochele Kovalski Lopes¹, Tatiana Pereira Gonzalez¹, Clarice Alho².

1 - Divisão de Genética Forense – Instituto-Geral de Perícias do Rio Grande do Sul.
255 Avenida Azenha, Porto Alegre, RS, Brazil.

2 - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
6681 Avenida Ipiranga, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: *laiana-beltrami@igp.rs.gov.br*. Phone and fax: 555132336477.

Abstract

Brazil has recently started to upload genetic profiles in the National Bank of Genetic Profiles (NBGP), which uses CODIS technology. Thus, a study is necessary in order to define priorities to begin the analysis of unanalyzed cases. Besides, it is important to improve extraction techniques so that autosomal DNA profiles from perpetrators can be detected. Towards this goal, 272 cases of sexual assault concluded by the Division of Forensic Genetics in General Institute of Forensics - RS were evaluated, and the differential extraction protocol standardized by the FBI was tested in 18 samples. Through closed cases analysis, it was found that the genetic profile from the offender is more likely to be obtained from samples collected within 24 hours after the act, from samples stored for less than two years and from evidence positive for sperm cells or prostatic specific antigen, with the best results in clothing. Furthermore, our data indicates that recidivist behavior is more likely to occur in unknown offenders than in known ones. Through the differential extraction technique it was possible to obtain the genetic profile of the perpetrator from single-source or mixed profiles in about 50% of the cases. However, in some cases it was not possible to obtain Y-chromosome profiles that had previously been obtained when non-differential extraction was performed.

Keywords

DNA profile, Sexual Assault, DNA backlog, DNA databank.

Introduction

The need to obtain genetic profiles to be added to DNA databank is a recent reality in Brazil, since only in 2012 the legislative power started to regulate the creation and the use of the National Bank of Genetic Profiles (NBGP), which counts with CODIS technology [1]. It is well known that because of the nature of the crime, sexual assault tends to leave traces that allow the identification of the perpetrator in about 50% of cases [2], and due to the possibility of additional offenses by the criminal, it is recommended to insert the genetic profiles generated in DNA banks [3].

In the state of Rio Grande do Sul, Brazil, approximately 2,000 requirements of sexual assaults without suspects are comprised in the backlog of the Division of Forensic Genetics from General Institute of Forensics - RS (DFG-RS). Due to the pile up of analysis, an evaluation of the several characteristics of the cases is needed in order to establish priorities with the aim to optimize resources and to generate genetic profiles efficiently [4].

Considering that the Y-chromosome short tandem repeat (STR) profiles is usually sufficient for the solution of direct confrontation cases [5], mainly when the suspects are unrelated, this was the primary goal of genetic analysis for the majority of sexual assault cases in DFG-RS. With the launch of NBGP, the analysis of cases without suspects lead to the necessity of generating autosomal genetic profiles for sex offenders. The present work intends to identify, among a sample of concluded sexual assault cases in DFG-RS, characteristics that could predict success in the detection of genetic profiles that are candidates to be added to NBGP. Therefore, we seek also to compare the quality of results generated by criminal evidence from sexual assaults extracted by two different methods.

Materials and Methods

The characteristics of 272 sexual assault cases with women as victims, concluded by DFG-RS between 2010-2012, as well as the DNA results obtained from evidence were evaluated. The data assessed were: age of the victim at the time of the crime, classifying the victims as children (≤ 10 years of age), adolescents (> 10 years of age) or adults (> 19 years of age); relationship between victim and perpetrator (known or unknown); types of evidence sent for analysis (clothing, vaginal or anal smear slides, vaginal or anal swabs); post-coital interval, or in other words, time between the assault and the collection of the sample (first 24 hours, 24-48 hours, 48-72 hours, after 72 hours); time between the assault and the samples analysis (first year, 1-2 years, 2-3 years, after 3 years); presence of sperm cells or prostate specific antigen (PSA) (presence or absence) and types of DNA extraction and DNA amplifications kits. Information about criminal recidivism of identified offenders was also searched for in their criminal records. The detection or not of a genetic profile of Y-chromosome and of an autosomal profile of the offender from evidence was also verified. Profiles with 11 STR regions or more (> 50 RFU) were identified as "Profile Y-STR". Single-source female autosomal profiles were considered as "Victim", mixed profiles in which the offender autosomal profile could be interpreted were identified as "Mixture", and single-source male autosomal profiles were identified as "Male".

Furthermore, 18 samples collected at least in duplicates (14 vaginal swabs and 4 anal swabs) from cases in which the offenders were unknown were analyzed. The samples were extracted by the non-differential method (NDE) with phenol-chloroform and concentrated with the filtering device Microcon[®] (Merck Millipore), and by the differential method (DE) with phenol-chloroform, standardized by the FBI and recommended by the National

Public Security Secretariat (SENASP) [6] in order to check the ability to obtain a genetic profiles that could be inserted into the NBGP database. Sperm fractions DNA from the analyzed cases was amplified with commercial kits AmpFISTR® Identifiler® Plus and AmpFISTR® Yfiler™. DNA genotyping was performed on 3130 Genetic Analyzer, from Life Technologies.

Results

Analysis of Concluded Cases

The average age of the victims from the concluded cases was 20.2 years old. The information about post-coital interval was only available for 165 cases, and the majority of the victims (52.7%) sought for legal-medical aid within 24 hours after sexual assault. Sample collection for children victims occurred at a later time point (1.5 days) than the collection for adolescents (0.9 day) and adults (0.4 day). In 17.3% of the cases, the offender autosomal profile was detected. Table 1 shows the results according to the sample type.

Table 1 – DNA results from analysis of concluded cases.

Evidence	Y-STR profile	Autosomal profile	
		Mixture	Male
Vaginal smear slide (n=51)	37.2%	9.8%	0%
Anal smear slide (n=13)	15.4%	7.7%	0%
Vaginal swab (n=218)	47.7%	11%	1.8%
Anal swab (n=52)	30.8%	3.8%	0%
Clothing (n=40)	82.5%	20%	20%

The information about the relationship between victim and offender was available for 242 cases, and in 37.2% of the cases, the perpetrator was an individual who was unknown to the victim. The sample collection when offender was known occurred at a latter time point (average 1 day) than the collection when the offender was unknown (0.5 days). In addition, detection of male DNA (at least Y-STR) was more frequent among unknown perpetrators cases (71%) than known perpetrators cases (33.5%). Through the analysis of criminal records of the identified offenders, it was possible to determine that recidivism is more likely to occur among perpetrators that attack unknown women (48.2%) than among the ones who attack known women (14.3%).

In 93.4% of the cases, DNA was extracted by NDE and concentrated by a Microcon® filtering device. In the remainder samples, the extraction was by DE. Concerning autosomal DNA amplification, several kits was used, such as: AmpFISTR® Identifiler™, AmpFISTR® Identifiler Plus™, AmpFISTR® Minifiler™ and AmpFISTR® NGM™ (Life Technologies); PowerPlex®16 System and PowerPlex®16 HS System (Promega). About Y-STR amplification, the kit PowerPlex®Y23 System (Promega) was used only in one case and AmpFISTR® Yfiler™ (Life Technologies) was used in the remainder.

Through the analysis of time between the assault and the samples analysis, we noted that the analyzes whose reports were issued within one year after the assault (n = 134) have provided autosomal profiles in 15.7% of cases; between one and two years (n = 48) in 29.2%; between two and three years (n = 26) in 7.7 %; after three years (n = 57) in 5.3 % of cases.

We found that it is more likely to retrieve male genetic material from samples collected within less than 24 hours after the assault. The recover of autosomal DNA follows the same pattern, decreasing over time (Table 2). With regards to detection of Y-STR and autosomal profile, we were able to detect more frequently in cases involving adolescents (52.1% and 17.1%, respectively) and adults (69.2% and 21.1%) than in cases involving children (17.9% and 7.1%).

Table 2 – Relation between post-coital interval and obtained autosomal and Y-STR profiles.

Post-coital interval	Y-STR profiles	Mixture or male single source profiles
First 24 h (n=87)	62.1%	27.6%
Between 24h e 48h (n=53)	56.6%	18.9%
Between 48h e 72h (n=13)	15.4%	7.7%
After 72h (n= 12)	16.7%	0%

Through the analysis of evidence (Table 3), we could verify that it is easier to obtain male genetic material from evidence that test positive for the presence of sperm cells or PSA. We also uncovered that the retrieval of male autosomal DNA from single-source is more evident in clothing positive for PSA, that does not test negative for sperm cells, than in swabs or slides containing internal secretion from the victim that tested positive for the presence of sperm cells (Table 3). Samples from 51 cases were not analyzed for the presence of sperm cells nor PSA.

Table 3 – Relation between evidences characteristics and obtained autosomal and Y-STR profiles.

Evidence ^a	Y-STR Profile	Autosomal Profile	
		Mixture	Male
Vaginal smear slide (sperm +) (n=31)	45.2%	9.7%	0%
Vaginal swab (sperm +) (n=71)	71.8%	25.3%	2.8%
Vaginal swab (sperm -)	32.2%	2.9%	1%

(n=102)			
Vaginal swab (sperm - and PSA -) (n=14)	14.3%	0%	0%
Anal swab (sperm -) (n=37)	35.1%	2.7%	0%
Clothing (sperm -, PSA +) (n=11)	63.6%	30%	0%
Clothing (PSA +) (n=12)	84.4%	25%	16.6%

^a The following evidences are not shown in the table, due to the low number (<10) in each category: vaginal smear slides negative for spermatozoa (n=6); anal smear slides positive (n=7) and negative (n=0) for spermatozoa; anal swabs positive for spermatozoa (n=2); anal swabs tested only for PSA (n=0), or combined with cytological test for spermatozoa (n=3); vaginal swabs tested only for PSA (n=5), or combined with cytological test for spermatozoa not shown in table; clothing negative for PSA (n=1), clothing tested only for spermatozoa (n=5), or combined with cytological test for spermatozoa (n=9).

Since the clothing and vaginal swabs showed the highest rates of DNA perpetrator recovering, we chose to better assess cases with both evidence. Only six cases presented both evidences positive for spermatozoa or PSA. Through this analysis, it was found that none of the swabs generated autosomal male profiles. However, in three of them it was possible to obtain autosomal alleles of the aggressor in the analyzed panties.

Comparison between extraction methods

The data found for the 18 samples analyzed through DE protocol in comparison with NDE are described in Table 4. In 50% of the analyzed samples, it was possible to obtain single-source male profiles or mixtures. Moreover, the DE method employed showed satisfactory results, and in 44.4% of the samples there was an improvement in profile quality when compared to NDE. In Table 5, are shown the results according to the presence or absence of spermatozoa. All analyzed cases presented amplification in Y-chromosome profile through NDE. However, through DE, in some cases, was not detected the same quality Y-STR profile obtained, previously, through NDE (data not tabulated).

Table 4 – Autosomal DNA profile for 18 samples extracted with differential and non-differential protocols.

Evidence	Autosomal Profile		
	Number of samples	Non-differential	Differential
Vaginal Swab	1	Victim	Inconclusive
	6	Victim	Victim

	1	Male	Male
	3	Mixture	Male
	3	Victim	Mixture
Anal Swab	1	Victim	Mixture
	2	Victim	Victim
	1	Mixture	Male

Table 5 - Autosomal DNA profile for 18 samples extracted with differential extraction according to the presence or absence of spermatozoa.

Evidence	Autosomal Profile	
	Mixture	Male
Vaginal swabs (sperm +) (n=8)	37.5%	50%
Vaginal swabs (sperm -) (n=6)	0%	0%
Anal swabs (sperm -) (n= 4)	25%	25%

Discussion

Analysis of Concluded Cases

The average age of the victims in this study supports previously published results, pointing to the fact that young women and adolescents are the majority of rape victims [7-8]. Even though the age of the victims was a factor that influenced the detection of male genetic profiles, this was probably due to the fact that the interval between the offense and the sample collection in children was bigger than in adolescents and adults. This occurs possibly because of a delay in complaint from the younger victims that may not understand the abuse they suffered or may not know their rights. Our data is consistent with what others have shown, that the majority of cases of sexual assault are performed by individuals who are familiar to the victims [8-9]. This information might be underestimated, since, in those cases, the victims usually feel coerced into not reporting the offender, because they are afraid of retaliation [10]. Furthermore, since vaginal swabs and vaginal smears were more frequently sent for analysis than anal swabs and smears, our results corroborate that vaginal penetration is the most common assault [8].

Our data shows that recidivism is more frequent among unknown perpetrators. In addition, in these cases, the sample collection occurred at an earlier time point and the DNA recovering is more probable. These data points to the need of prioritizing this type of crime, considering the goal of identifying coincidences in the NBGP.

The better success rate in the detection of Y-chromosome haplotypes, compared to an autosomal profile from the offender (Table 1) can be attributed to the nature of this lineage marker. Since in the mixed men-women DNA sample the Y-chromosome is not susceptible to the preferential amplification phenomena, we frequently obtain a Y-chromosome haplotype even in samples with a very large disparity between male and female DNA. In the last 10 years, a series of studies with controlled samples and very uneven proportions of

male DNA to female DNA were published. Prinz and co-authors [11] demonstrated in experimental models that the minor male component in a male-female mixture could be detected at a rate of up to 1:4000 in a tetraplex system of Y-STR and 0.4 ng of male DNA as the minor component. The authors were able to genotype at a rate of 1:600 (0.5 ng of male DNA) with a hexaplex [12].

It is not surprising that the detection of a male genetic profile was more frequent in cases in which sample collection was performed within 24 hours (Table 1) and in cases in which the presence of sperm cells or PSA was detected in the samples analyzed (Table 2). As already mentioned, it is known that swabs that are collected from sexual assault victims usually present unfavorable male:female autosomal DNA proportions, and that the quality of male genetic profiles tends to decrease with the increase of interval between offense and collection. [13].

Similarly, the fact that samples with longer storage have shown a lower rate of autosomal DNA retrieval is also not surprising. Although the samples remain under refrigeration, the elapsed time affects the quality of DNA by factors such as degradation [14].

Our data is consistent with that of other authors [15] that have shown that the detection of a Y-chromosome profile is possible within 72 hours after the sexual act (Table 1). Likewise, we have shown that the lack of sperm cells, mainly when accompanied by the presence of PSA, although it can be considered as a fact that can potentially diminish the success rate, is not a determinant to the non-obtainment of a perpetrator genetic profile in sexual assault samples. This could be explained by the presence of other cells from the perpetrator that are different from sperm cells, or by the possibility of the offender being vasectomized or azoospermic [16]. On the other hand, the presence of sperm cells in cytological assays is also not a determinant of the detection of a genetic profile from the perpetrator in sexual traces. We suggest that this occurs because the positive cytological diagnosis can be based on the presence of very few sperm cells, even less than 4 cells per slide [17]. Thus, it is possible to have a positive result for the cytological exam without the amount of male cells needed for the detection of a conclusive genetic profile. The difference between the results from the cytological assays and the DNA has been reported in other studies [18-19].

In clothing, the probability of obtaining a male autosomal genetic profile from single-source is higher, possibly due to a better male:female DNA proportion than that of vaginal swabs. In the vaginal cavity, there is a decrease in the number of sperm cells with time, caused by factors such as personal hygiene of the victim, menstruation, semen absorption and damage to the cell membrane of the male gametes [20]. However, the fact that the presence of genetic material in clothing can be due to consensual sexual intercourse cannot be ignored, since it has been documented that washed clothing can test positive for the presence of sperm cells as well as for the presence of semen and DNA markers [21-22].

Comparison between extractions

Through DE, we obtained more autosomal genetic profiles from perpetrators and it was possible to generate genetic profiles from mixtures or male single-sources in the samples where previously, through NDE, only the genetic profile from the victim or a mixture had been detected. Also, the rate of genetic profile detection is beyond the one obtained in other studies when swabs are analyzed (approximately 30%) [2] and beyond the one obtained in our concluded cases (17.3%).

Either way, we can clearly distinguish the applicability of DE and NDE through data shown in Table 3. Briefly, the DE method consists in a first incubation step with detergent buffer and proteinase K that degrades only epithelial cells, leaving the sperm cells intact, which helps to reduce the proportion between the minor male component and the major female component. In a second step, sperm cells are incubated in a buffer containing proteinase K and DTT, and male DNA is extracted [6]. This reduction in the female component relative to the male component is not a determinant of success, but it increases the possibility of obtaining a genetic profile from the perpetrator in the sample mixture [5]. Still, the steps of separation and washing of the extracts can lead to loss of genetic material during DE, which is not evidenced in NDE. So, DE is ideal for sexual assault cases involving male offenders and female victims in which there is enough material (e.g., two or more swabs). In other cases, NDE results in a superior amount of final genetic material, what facilitates the detection of, at least, a Y-STR profile from the perpetrator.

The DE method, widely used to separate sperm cells nuclei from vaginal cellular debris in vaginal swabs, is very important to generate autosomal DNA profiles from sperm cells [5]. However, the limitations of the DE technique should be made clear. Several types of non-spermatic cells from the perpetrator cannot be identified by this method. Shewale and co-authors evaluated semen samples from azoospermic individuals post-vasectomy for Y-chromosome STRs and they found a broad variety in the results of extracted DNA, from 12.5 to 1 ng, a difference that was credited to different amounts of epithelial cells and/or leucocytes [15]. DE also tends to fail or to be ineffective in cases with sperm cells DNA that is old or degraded, or from oligospermic individuals. Sperm cells that are collected after a longer post-coitus interval, which may present fragility in the membrane, can undergo premature lysis during the lysing step of epithelial cells even without DTT [23]. It is believed that male DNA losses in the sperm fraction in DE, when compared to NDE, can be up to 98% [24]. Furthermore, mixtures in which there are several male cells besides sperm cells cannot be resolved by differential lysis (for example, incidents of sexual offense in which saliva is the evidence, or when the victim scratches the perpetrator). In these cases, the use of Y-chromosome STRs is more suitable. However, our results showed that even samples negative for sperm test showed autosomal profiles through DE. We suggest this may have been caused by incomplete lysis of non-sperm cells during the first incubation step of DE or undervisualization of sperm cells during the microscopic research.

Conclusion

According to our data, we recommend to prioritize DNA analysis from backlog with the following characteristics:

- 1) Cases involving perpetrators who are unknown to the victims, as they have higher recidivist behaviour;
- 2) Cases in which the samples were collected within less than 24 hours after the assault;
- 3) Cases in which the analyzed material tests positive for the presence of sperm cells or PSA. We also suggest that, for cases with the availability of clothing and vaginal swabs when both test positive for the presence of sperm cells or PSA, the analysis should begin by the clothing;
- 4) Cases with evidence in enough amounts can be analyzed through a first non-differential extraction and a second eventual differential extraction, in order to secure the detection of a Y-STR profile and to try to obtain a genetic autosomal profile from the offender to be included in the NBGP, respectively.

In our study, for example, cases that fit the characteristics above showed a success rate of 83% in the detection of a genetic profile from the perpetrator to be included in the NBGP.

Our recommendation for the initial screening of backlog cases does not exempt, in a second analysis, the evaluation of other cases that do not fit in the cited characteristics. Furthermore, we recommend that the analysis of older backlogged cases are started before the recent cases to avoid irreparable losses.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Brasil. Lei 12.654 de 28 de maio de 2012. Altera as Leis nºs 12.037, de 1º de outubro de 2009, e 7.210, de 11 de julho de 1984 - Lei de Execução Penal, para prever a coleta de perfil genético como forma de identificação criminal, e dá outras providências. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12654.htm. Accessed 08 March 2015.
- [2] Gingras F, Paquet C, Bazinet M, Granger D, Marcoux-Legault K, Fiorillo M, Seguin D, Baltzer F, Chamberland C, Jolicoeur C (2009) Biological and DNA evidence in 1000 sexual assault cases. *Forensic Sci Int Genet* 2(1):138-140.
- [3] Gabriel M, Boland C, Holt C (2010) Beyond the Cold Hit: Measuring the Impact of the National DNA Data Bank on Public Safety at the City and County Level. *J. Law Med Ethics* 38(2):396-411. doi: 10.1111/j.1748-720X.2010.00498.x.
- [4] Ritter N (2011) Special Report: The Road Ahead: Unanalyzed Evidence in Sexual Assault Cases. U.S. Department of Justice, Office of Justice Programs, National Institute of Justice. <https://ncjrs.gov/pdffiles1/nij/233279.pdf>. Accessed 05 March 2015.
- [5] Roewer L (2009) Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci Med Pathol* 5(2):77-84. doi: 10.1007/s12024-009-9089-5.
- [6] FBI (1999) *apud* Brasil (2013). Procedimento Operacional Padrão – Perícia Criminal, Secretaria Nacional de Segurança Pública – Ministério da Justiça.
- [7] Grossin C, Sibille I, Lorin de la grandmaison G, Banasr A, Brion F, Durigon M (2003) Analysis of 418 cases of sexual assault. *Forensic Sci Int* 28;131(2-3):125-130.
- [8] Riggs N, Houry D, Long G, Markovchick V, Feldhaus KM (2000) Analysis of 1,076 Cases of Sexual Assault. *Ann Emerg Med* 35(4):358-62.
- [9] Kendall-Tackett KA, Williams LM, Finkelhor D (1993) Impact of sexual abuse on children: A review and synthesis of recent empirical studies. *Psychol Bull* 113(1):164-180.
- [10] Kellogg ND, Menard SW (2003) Violence among family members of children and adolescents evaluated for sexual abuse. *Child Abuse Negl* 27(12):1367-1376.
- [11] Prinz M, Boll K, Baum H, Shaler R (1997) Multiplexing of Y-chromosome specific STRs and performance

for mixed samples. *Forensic Sci Int* 85:209–218. doi:10.1016/S0379-0738(96) 02096-8.

[12] Shewale JG, Sinha SK (2003) Y-Short tandem repeat multiplex systems - Y-PLEX TM6 and Y-PLEXTM5. *Forensic Sci Rev* 15:116–135.

[13] Garvin AM, Bottinelli M, Gola M, Conti A, Soldati G (2009) DNA preparation from sexual assault cases by selective degradation of contaminating DNA from the victim. *J Forensic Sci* 54(6):1297-1303.

[14] Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A (2010) Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA - a review. *Forensic Sci Int Genet* 4(3):148-57. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.09.007.

[15] Allery JP, Telmon N, Mieusset R, Blanc A, Rouge D (2001) Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. *J. Forensic Sci* 46:349–351.

[16] Shewale JG, Sikka SC, Schneida E, Sinha SK (2003) DNA profiling of azoospermic semen samples from vasectomized males by using Y-PLEX 6 amplification kit. *J Forensic Sci* 48(1):127-129.

[17] Astrup BS, Thomsen JL, Lauritsen J, Ravn P (2012) Detection of spermatozoa following consensual sexual intercourse. *Forensic Sci Int* 10;221(1-3):137-41. doi: 10.1016/j.forsciint.2012.04.024.

[18] Sibille I, Duverneuil C, De La Grandmaison LG, Guerrouache K, Teissière F, Durigon M, De Mazancourt P (2002) Y STR DNA amplification as biological evidence in sexually assaulted female victims with no cytological detection of spermatozoa. *Forensic Sci Int* 125(2-3):212–216.

[19] Soares-Vieira JA, Billerbeck AE, Iwamura ES, Zampieri RA, Gattás GJ, Munoz DR, Hallak J, Mendonca BB, Lucon AM (2007) Y-STRs in Forensic Medicine: DNA Analysis in Semen Samples of Azoospermic Individuals *J Forensic Sci* 52(3):664-670.

[20] Hall A, Ballantyne J (2003) Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervicovaginal samples. *Forensic Sci Int.* 136:58–72.

[21] Kafarowski E, Lyon AM, Sloan MM (1996) The retention and transfer of spermatozoa in clothing by machine washing. *J. Can. Soc. Forensic Sci* 9(1):9-11. doi: 10.1080/00085030.1996.10757042

[22] Jobin RM, De Gouffe M (2003) The persistence of seminal constituents on panties after laundering. Significance to investigations of sexual assault. *J. Can. Soc. Forensic Sci* 36(1):1-10. doi: 10.1080/00085030.2003.107575.

[23] Ballantyne J (2013) Final Report: DNA Profiling of the Semen Donor in Extended Interval Post-Coital Samples. U.S. National Center for Forensic Science - Department of Justice, National Institute of Justice. <https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/241299.pdf>, Accessed 05 March 2015.

[24] Vuichard S, Borer U, Bottinelli M, Cossu C, Malik N, Meier V, Gehrig C, Sulzer A, Morerod M e Castella V (2011) Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a Swiss collaborative study. *Investig Genet* 2:11. doi: 10.1186/2041-2223-2-11.

Capítulo III

Estudo dos casos pendentes analisados

1. ANÁLISE DOS CASOS PENDENTES

1.1 Origem dos casos

A fim de se aprimorar a obtenção de perfis genéticos autossômicos dos agressores sexuais a partir das amostras colhidas das vítimas, 31 casos pendentes, com vítimas do sexo feminino, cujos agressores eram desconhecidos, foram submetidos à análise. As 18 amostras descritas no artigo apresentado no Capítulo II fazem parte desses 31 casos.

1.2 Seleção das amostras

Os critérios de inclusão utilizados foram:

- vítima do sexo feminino;
- agressor desconhecido;
- amostras questionadas provenientes de secreção vaginal e/ou anal, encaminhadas em *swab* ou lâmina microscópica.
- encaminhamento de amostra de referência da vítima (sangue periférico ou *swab* oral)
- termo de autorização de coleta assinado pela vítima ou responsável (Anexo A ou similar, próprio de cada Posto-Médico Legal).

1.3 Dados coletados

Foram descritos os seguintes dados referentes aos casos analisados na segunda etapa do estudo:

- idade da vítima;
- número e tipo de material encaminhado para análise;
- número de materiais encaminhados de cada local amostrado;
- tempo transcorrido entre agressão e a coleta (intervalo pós-coito);
- resultado de análise microscópica para presença de espermatozoides;
- resultado de testes imunológicos relativos à presença de sêmen.

Para o tratamento dos dados utilizou-se a estatística descritiva por meio de números absolutos e relativos.

1.4 Obtenção de DNA

As amostras de referência das vítimas foram extraídas pelo método FTA® (ANEXO B). Em relação às amostras questionadas, o DNA dos materiais biológicos dos casos

selecionados foi extraído conforme o tipo e a quantidade de amostra, como segue e conforme demonstrado na Figura 1:

- Casos com apenas um material colhido de cada local corporal (p.ex, um *swab* vaginal e um *swab* anal): o DNA do material foi extraído por método orgânico não-diferencial (FBI, 1994) (ANEXO C) e purificado e concentrado com o dispositivo de filtração Microcon®.
- Casos com dois materiais colhidos de cada local corporal (p.ex, dois *swabs* vaginais ou dois *swabs* vaginais e dois anais): um dos materiais de cada local teve o DNA extraído por método orgânico não-diferencial e purificado com o dispositivo Microcon®. Caso fosse obtido ao menos 11 *loci* Y-STR no primeiro material, o segundo foi extraído com o método diferencial padronizado pelo FBI, indicado pela SENASP (FBI, 1999 *apud* Brasil, 2013c). (ANEXO D). Em caso de não obtenção de haplótipo mínimo no primeiro material, o segundo também será extraído pelo método orgânico não-diferencial e purificado com Microcon®.
- Casos com três materiais colhidos de cada local corporal (p. ex, três *swabs* vaginais ou três *swabs* vaginais e três anais): um dos materiais teve o DNA extraído por método orgânico não-diferencial e purificado com Microcon®. Em caso de obtenção de ao menos 11 *loci* Y-STR no primeiro material, os dois restantes foram partidos na metade. Uma das metades do segundo material, mais uma das metades do terceiro material foram unidas extraídas pelo método diferencial com a incubação de 2h a 37°C referida no protocolo e as outras duas metades, com o tempo e temperatura de incubação da fração não-espermática alterado para 56°C *overnight*. Essa condição de incubação é a mesma utilizada no protocolo de extração orgânica não diferencial. Em caso de não obtenção de 11 *loci* Y-STR no primeiro material, o segundo também foi extraído pelo método orgânico não diferencial e purificado com Microcon® e assim sucessivamente.

1.5 Amplificação e genotipagem; Análise de marcadores STR

A amplificação simultânea de 15 *loci* STR (multiplex PCR) e o marcador para determinação do sexo, amelogenina, foi realizada utilizando o kit comercial AmpFISTR® Identifiler Plus™ da empresa Life Technologies de acordo com protocolo validado pela DGF-IGP-RS. A amplificação de marcadores de cromossomo Y foi realizada usando o kit

AmpFISTR[®] Yfiler[™] da empresa Life Technologies de acordo com protocolo validado pela DGF-IGP-RS. A genotipagem dos produtos de PCR foram realizadas por eletroforese capilar no sequenciador *ABI PRISM[™] 3130 Genetic Analyzer*, com auxílio dos softwares *Data Collection v.3.0 e GeneMapper ID v.3.2.1*.

2. Resultados

O tempo médio entre a agressão sexual e a coleta foi de aproximadamente 0,80 dias. A média de idade das vítimas foi de 22,3 anos. A taxa geral de obtenção de perfis autossômicos com todos os alelos do agressor em pelo menos uma das amostras analisadas em cada caso foi de 32,26%.

Todos os casos analisados possuíam pelo menos um *swab* vaginal. Desses, 10 casos possuíam apenas um, os quais foram extraídos por extração orgânica não-diferencial. Dos 21 casos restantes, apenas 14 casos foram submetidos à extração orgânica diferencial, visto que em 7 casos não foi observada a presença de material genético masculino através da extração orgânica não-diferencial.

Doze (12) dos casos analisados possuíam *swabs* anais. Desses, quatro casos possuíam apenas um *swab* anal, os quais foram extraídos por extração orgânica não-diferencial. Dos 08 casos restantes, apenas quatro casos foram submetidos à extração orgânica diferencial, visto que em 8 casos não foi observada a presença de material genético masculino através da extração orgânica não-diferencial. Os materiais encaminhados para a extração diferencial (14 *swabs* vaginais e quatro *swabs* anais) foram analisados no capítulo II dessa dissertação.

16 amostras, que haviam sido colhidas em triplicata, (12 *swabs* vaginais e quatro *swabs* anais) foram submetidas a diferentes protocolos de extração. Foram analisados apenas os casos em que o primeiro *swab* extraído por orgânica não diferencial gerou perfil de cromossomo Y com pelo menos 11 loci STR.

As frações não espermática foram incubadas com protocolo diferencial padrão (37°C, 2 horas), descrito na Tabela 6 como “Dif Padrão” e com o protocolo modificado (56°C, overnight), descrito como “Dif Modificado”. A coluna “Não-Dif” revela os resultados obtidos quando da extração não diferencial. Os resultados estão apresentados na Tabela 1 De acordo com cada amostra analisada.

Tabela 1 – Comparação entre os protocolos diferenciais quanto à obtenção de perfil autossômico.

Materiais	Perfil Autossômico		
	Número de amostras	Diferencial Padrão	Diferencial Modificada
Swab Vaginal (espermatozoide -)	1	-	-
	1	Vítima	-
	2	Vítima	Vítima
	1	Vítima	Mistura
Swab Vaginal (espermatozoide +)	2	Masculino	Masculino
	2	Mistura	Mistura
	1	Vítima	Vítima
	1	Masculino	Mistura
	1	Mistura	Vítima
Swab Anal (espermatozoide -)	1	Mistura	-
	1	Vítima	-
	1	Vítima	Mistura
	1	Masculino	-

Conforme a Tabela 6, grande parte das amostras apresentou o mesmo resultado com a utilização dos protocolos. Em duas amostras, a incubação estendida apresentou resultados superiores quanto à obtenção de perfil do agressor, e em quatro amostras com incubação estendida os resultados foram inferiores ao protocolo tradicional quanto à obtenção de perfil do agressor.

5.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS DA ANÁLISE DOS CASOS PENDENTES

Quanto à idade das vítimas e ao tempo transcorrido entre a agressão e a análise, os resultados foram bastante semelhantes aos já obtidos nesse trabalho quando da análise dos casos concluídos entre os anos de 2010-2012. O número reduzido de casos que dispunham de pelo menos 3 swabs anais e/ou vaginais demonstra ser necessário maiores esforços no sentido de padronizar os procedimentos de coleta no IGP-RS.

A taxa total de inserção de perfis autossômicos no BNPG de 32,26% além de ser superior à previamente obtida nos casos concluídos entre os anos de 2010-2012 pela DGF-IGP-RS, é bastante semelhante ao obtido em estudos internacionais. Em New Orleans, a análise de 1008 casos pendentes permitiu o upload de 256 perfis masculinos no CODIS,

aproximadamente 25% (Ritter, 2013). Em estudo canadense, a taxa de obtenção de perfis masculinos e de misturas completas foi de 32% em materiais colhidos diretamente do corpo da vítima (Gingras et al., 2009).

Vale ressaltar que esse valor de 32,6% engloba tanto casos com presença quanto ausência de espermatozoides e também casos extraídos com NDE, visto apresentarem apenas um *swab* encaminhado.

A nossa proposta de modificação ao protocolo original proposto pela SENASP se deu devido à necessidade de eliminar o máximo possível de material da vítima presente na fração espermática, a fim de aprimorar a taxa de obtenção de perfis masculinos fonte única. Optou-se pela incubação a 56°C *overnight*, visto esse ser o padrão da extração orgânica utilizada na DGF-IGP-RS, sendo essa uma das extrações de DNA mais eficientes (Barbaro, et al., 2004; Köchl et al., 2005).

Provavelmente visto o número reduzido de amostras analisadas, os resultados obtidos na nossa proposta não apresentaram um padrão identificável, sendo que grande parte dos casos apresentou o mesmo resultado com a utilização dos dois protocolos. Os resultados obtidos com incubação estendida foram inferiores ao protocolo tradicional em algumas amostras, provavelmente pelo fato já referido nesse trabalho, de espermatozoides fragilizados se romperem quando da primeira incubação (Ballantyne, 2013). Em duas amostras, a metodologia modificada apresentou resultados superiores ao protocolo tradicional. Visto que ambos os materiais eram negativos para a presença de espermatozoides, possivelmente, uma incubação mais prolongada nesses casos auxiliou a melhorar a proporção de DNA feminino:masculino, tornando-a mais favorável para a obtenção de alelos do agressor. Contudo, mais estudos, com amostras controladas e com um número de amostras elevado, devem ser conduzidos no sentido de buscar-se um padrão a fim de se identificar em quais casos a incubação prolongada pode ser pertinente.

CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos nesse estudo foi bastante informativo quanto ao universo de materiais encaminhados para análise na DGF-IGP-RS. Através da análise detalhada dos parâmetros amostrados, foi possível traçar o perfil dos casos mais prováveis de gerarem perfis autossômicos inseríveis no BNPG. O presente estudo tornou possível traçarmos as seguintes recomendações para as análises de DNA backlog da DGF-IGP-RS, sempre com foco na busca de eventuais coincidências no BNPG:

1) deve ser dada preferência a casos envolvendo agressores desconhecidos, visto esses mostrarem uma maior tendência a reincidirem;

2) deve dar-se preferência a casos cujas amostras tenham sido colhidas nas primeiras 24h decorridas do fato, visto a obtenção de DNA autossômico do agressor sofrer decaimento com o passar do tempo;

3) deve dar-se prioridade aos materiais que apresentem resultados positivos para a presença de espermatozoides, visto esses apresentarem uma maior probabilidade de gerarem perfis inseríveis no BNPG;

4) recomenda-se que, nos casos que disponham de vestes e swabs vaginais ambos com resultados positivos para a presença de espermatozoides, seja iniciada a análise pelas vestes, visto essas, possivelmente, apresentarem uma proporção de DNA masculino:feminino mais favorável à obtenção de alelos autossômicos do criminoso;

5) indica-se que sejam analisados apenas casos que apresentem materiais em quantidade suficiente para uma segunda extração não diferencial, a fim de se obter, ao menos, perfil de cromossomo Y para um eventual confronto futuro, se necessário.

6) por fim, recomenda-se que a análise de casos mais antigos seja iniciada tão breve seja possível, a fim de se evitar perdas de material genético irreparáveis.

A fim de ilustração, seis casos dentro dos avaliados por nós na segunda etapa do trabalho apresentam todas nossas características recomendadas. Desses três apresentaram perfis masculinos fonte única e dois perfis de mistura contendo todos alelos do agressor. Apesar do número reduzidos de casos, esse resultado somado aos apresentados nesse estudo, demonstram que as recomendações tecidas tendem a auxiliar no número de inserções no BNPG.

Nenhum dos perfis genéticos obtidos nesse estudo apresentou coincidência com os perfis previamente inseridos no BNPG, nem com os perfis obtidos nos outros casos

analisados. Porém, os mesmos ficarão armazenados no BNPG até a prescrição do crime, revelando coincidências se o agressor reincidir.

Com objetivo de estimarmos a nossa futura demanda, calculou-se o número de casos do nosso estoque de casos pendentes que teoricamente se encaixariam nas recomendações, de acordo com os dados analisados nesse estudo. Partindo-se de um valor inicial de 2.215 casos que se configura como nosso *backlog* real, nosso cálculo previu um número de aproximadamente 110 casos.

Obviamente, o restante dos casos também deve ser analisado e essa recomendação serve para definir apenas quais amostras devem ser priorizadas. Em um segundo momento, nosso estudo também poderá servir de norte para novas recomendações, a fim de se ampliar o número de amostras analisadas.

Finalizando, vale ressaltar que, devido à recente instituição do BNPG no Brasil, não temos conhecimento de outro estudo semelhante conduzido no Brasil, tornando o presente estudo um importante balizador para outras realidades de laboratórios forenses brasileiros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amarijo CL, Acosta DF, Silva CD, Gomes VLO. Fatores associados à violência contra mulheres: análise de ocorrências policiais. *Cogitare Enferm.* 2014 Out-Dez; 19(4):761-7.
- Andrade RP, Guimarães ACP; Filho AF, Carvalho NS, Arrabal JS, Rocha DM., Medeiros JM. Características Demográficas e Intervalo para Atendimento em Mulheres Vítimas de Violência Sexual. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2001;23;9.
- Ballantyne J. Final Report: DNA Profiling of the Semen Donor in Extended Interval Post-Coital Samples. U.S. National Center for Forensic Science - Department of Justice, National Institute of Justice; 2013 Fev.
- Ballantyne J, Hanson E, Green R, Holt A, Mulero J. Enhancing the sexual assault workflow: Testing of next generation DNA assessment and Y-STR systems. *Forensic Sci Int Gen.* 2013(4):228–9.
- Benschop CCG; Wiebosch DC; Kloosterman AD, Sijen T. Post-coital vaginal sampling with nylon flocked swabs improves DNA typing. *Forensic Sci Int Gen.* 2010 Fev;4:115–21.
- Braga AGM, Angotti B, Matsuda FE. Das violências reais e simbólicas – a violência sexual contra mulheres no Brasil. *Boletim IBCCRIM.* 2014 Jan;254:7-8.
- Brasil. Decreto nº 7.950, de 12 de março de 2013. Institui o Banco Nacional de Perfis Genéticos e a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos.
- Brasil. Decreto nº 7.958, de 13 de março de 2013. Estabelece diretrizes para o atendimento às vítimas de violência sexual pelos profissionais de segurança pública e da rede de atendimento do Sistema Único de Saúde.
- Brasil. Procedimento Operacional Padrão – Perícia Criminal, Secretaria Nacional de Segurança Pública – Ministério da Justiça. 2013.
- Brasil. Lei 12.654 de 28 de maio de 2012. Altera as Leis nºs 12.037, de 1º de outubro de 2009, e 7.210, de 11 de julho de 1984 - Lei de Execução Penal, para prever a coleta de perfil genético como forma de identificação criminal, e dá outras providências.
- Brasil. Lei nº 12.015, de 7 agosto de 2009. Altera o Título VI da Parte Especial do Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940 - Código Penal, e o art. 1º da Lei nº 8.072, de 25 de julho de 1990, que dispõe sobre os crimes hediondos, nos termos do inciso XLIII do art. 5º da Constituição Federal e revoga a Lei nº 2.252, de 1º de julho de 1954, que trata de corrupção de menores.

- Brasil. Lei nº 12.037, de 1º de outubro de 2009. Dispõe sobre a identificação criminal do civilmente identificado, regulamentando o art. 5º, inciso LVIII, da Constituição Federal.
- Brasil. Lei nº 8.072, de 25 de julho de 1990. Dispõe sobre os crimes hediondos, nos termos do art. 5º, inciso XLIII, da Constituição Federal, e determina outras providências.
- Burg A, Kahn R, Welch K. DNA testing of sexual assault evidence: The laboratory Perspective. *J Forensic Nurs.* 2011 Set;7(3):145-152.
- Butler JM, Hill CR. Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. *Forensic Sci Rev.* 2012 Jan;15:24.
- Butler, JM. Approaches to statistical analysis of mixtures and degraded DNA. In: Butler, JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* 2ª ed. New York:Elsevier; 2005a. p 519-528.
- Butler, JM. Y chromosome DNA testing. In: Butler, JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* 2ª ed. New York:Elsevier; 2005b. P 201-239.
- Carson C, Garvin A, Gorman K. Automated Processing of Sexual Assault Cases Using Selective Degradation, Department of Justice, National Institute of Justice; 2013 Fev.
- Casoy IM Saldiva PHN, Pontes MBR, Júnior AM. Criação de unidade especializada em coleta de vestígios em DNA e padrões de comportamento do assassino sexual. *Revista Científica da FEPI.* 2010;3(3).
- Corovic J, Christianson SÅ, Bergman LR. From crime scene actions in stranger rape to prediction of rapist type: single-victim or serial rapist? *Behav Sci Law.* 2012 Nov-Dec;30(6):764-781.
- Facuri CO, Fernandes AMS, Oliveira KD, Andrade TS, Azevedo RCS. Violência sexual: estudo descritivo sobre as vítimas e o atendimento em um serviço universitário de referência no Estado de São Paulo, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 2013;29(5)889-898.
- Federal Bureau of Investigation (FBI) Crime Laboratory. PCR-based typing protocols. United States Department of Justice; 1994.
- Federal Bureau of Investigation (FBI) Crime Laboratory. PCR-based typing protocols. United States Department of Justice; 1999 *apud* Brasil. Procedimento Operacional Padrão – Perícia Criminal, Secretaria Nacional de Segurança Pública – Ministério da Justiça; 2013.

- Federal Bureau of Investigation (FBI). CODIS Brochure. Disponível em: http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/codis_brochure). Acessado em 10/03/2015.
- Federal Bureau of Investigation (FBI). CODIS NDIS - Statistics. Disponível em: <http://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/ndis-statistics>. Acessado em: 05/03/2015.
- Ferreira JD. [Tese]: Estudo de fatores relacionados com a violência sexual contra crianças, adolescentes e mulheres adultas. Centro de Referência da Saúde da Mulher e de Nutrição, Alimentação e Desenvolvimento Infantil para obtenção do título de Doutor em Medicina; 2000.
- Garvin AM, Bottinelli M, Gola M, Conti A, Soldati G. DNA preparation from sexual assault cases by selective degradation of contaminating DNA from the victim. *J Forensic Sci.* 2009 Nov;54(6):1297-1303.
- Garvin AM, Fischer A, Schnee-Griese J, Jelinski A, Bottinelli M, Soldati G, et al. Isolating DNA from sexual assault cases: a comparison of standard methods with a nuclease-based approach. *Investig Genet.* 2012 Dez;3:25.
- Ge J, Budowle B. Developing criteria and data to determine best options for expanding the core CODIS loci. *Investig Genet.* 2012 Jan 6;3:1.
- Ge J, Sun H, Li H, Liu C, Yan J, Budowle B. Future directions of forensic DNA databases. *Croat Med J.* 2014;Apr; 55(2): 163–166.
- Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA fingerprints. *Nature.* 1985 Dez; 318(6046):577-579.
- Gingras F, Paquet C, Bazinet M, Granger D, Marcoux-Legault K, Fiorillo M, Séguin D, Baltzer F, Chamberland C, Jolicoeur C. Biological and DNA evidence in 1000 sexual assault cases. *Forensic Sci Int Genet.* 2009 Dez;2(1) 138-140.
- Godinho NMO. Banco de DNA: uma ferramenta a serviço da justiça. *REBESP.* 2014;7(2) 20-30.
- Hall A, Ballantyne J. Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervicovaginal samples. *Forensic Sci Int.* 2003 Set; 136:58–72.
- Hampikian G, West E, Akselrod O. The Genetics of Innocence: Analysis of 194 U.S. DNA Exonerations. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011 Set;12:97–120.

- Innocence Project. Exonerations. Disponível em: <http://www.innocenceproject.org/free-innocent/exonerating-the-innocent>. Acessado em 26/02/2015.
- Jobling M, Gill P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat Rev Gen.* 2004 Out(5),739-751.
- Köchler S, Niederstätter H, Parson W. DNA Extraction and Quantitation of Forensic Samples Using the Phenol–Chloroform Method and Real-Time PCR. *Methods Mol Bio.* 2005;297:13-29.
- Laberke PJ, Grossenbacher R, Hausmann R, Balitzki B. Method to predict the chance of developing a male profile out of mixtures of male and female DNA. *Int J Legal Med.* 2012 Jan;126(1):157-160.
- LeBeau, JL. The journey to rape: Geographic distance and the rapist's method of approaching the victim. *Journal of Police Science and Administration.* 1987 Jun;15(2): 129–136.
- Madi SRC, Knob LF, Lorencetti J, Marcon NO, Madi JM. Violência sexual. Experiência do Programa de Atendimento às Vítimas de Violência Sexual PRAVIVIS, do Hospital Geral de Caxias do Sul, RS, Brasil. *Revista da AMRIGS.* 2010 jan-mar;54 (1): 13-18.
- Maia FAS. Mapeamento molecular e criminal de crimes sexuais em série no Distrito Federal entre os anos de 1999 e 2010. [Dissertação]. Brasília (DF): Universidade Católica de Brasília; 2010.
- Mulero JJ, Chang CW, Calandro LM, Green RL, Li Y, Johnson CL et al. Development and Validation of the AmpFSTRs Yfiler™ PCR Amplification Kit: A Male Specific, Single Amplification 17 Y-STR Multiplex System. *J Forensic Sci.* 2006 Jan;51(1):64-75.
- Nelson, M. Special Report: Making Sense of DNA Backlogs, 2010 - Myths vs. Reality. U.S. Department of Justice, Office of Justice Programs, National Institute of Justice; 2011 Fev.
- Olofsson J, Mogensen HS, Hjort BB, Morling N. Evaluation of Y-STR analyses of sperm cell negative vaginal samples. *Forensic Sci Int Gen.* 2011 Ago;3:141–e142.
- Olson R, Cowan C. Tech Tips – Automating the Differex™ System, Profiles in DNA. 2007 Set;19–20.
- Peterson J, Johnson D, Herz D, Graziano L, Oehler T. Special Report: Sexual Assault Kit Backlog Study. U.S. Department of Justice, Office of Justice Programs, National Institute of Justice; 2012 Jun.

- Prata N. A mídia e o mito: uma análise do papel da imprensa mineira na construção da trajetória do estuprador da Zona Sul. *Mediação*. 2009 jan-jul;9(8).
- Riggs N, Houry D, Long G, Markovchick V, Feldhaus KM. Analysis of 1,076 Cases of Sexual Assault. *Annals of Emergency Medicine*. 2000 Abr; 358-362.
- Ritter N. 2011. Special Report: The Road Ahead: Unanalyzed Evidence in Sexual Assault Cases. U.S. Department of Justice, Office of Justice Programs, National Institute of Justice; 2011 Mai.
- Ritter N. New Orleans sexual assault evidence project: results and recommendations. *Institute of Justice Journal*. 2013 Set;272:13-18.
- Roman JK, Reid S, Reid J, Chalfin A, Adams W, Knight C. Research Report: The DNA Field Experiment: Cost-Effectiveness Analysis of the Use of DNA in the Investigation of High-Volume Crimes. U.S. Urban Institute, Justice Policy Center; 2008 Mar.
- Schiocchet T, et al. Banco de perfis genéticos para fins de persecução criminal. *Série Pensando o Direito*, vol. 43. Brasília: Ministério da Justiça, 2012.
- Shewale JG, Sikka SC, Schneida E, Sinha SK. DNA profiling of azoospermic semen samples from vasectomized males by using Y-PLEX 6 amplification kit. *J Forensic Sci*. 2003 Jan;48(1):127-129.
- Simoncelli T, Wallace H. Expanding Databases, Declining Liberties. *Genewatch*. 2006 Jan-Fev;19(1):3-8.
- SINAN/SVS/MS. Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde. Disponível em: dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/violencia/bases/violebrnet.def. Acessado em 02/03/2015.
- Sinha SK, Budowle B, Arcot SS, Richey SL, Chakraborty R, Jones MD, et al. Development and validation of a multiplexed Y-chromosome STR genotyping system, Y-PLEX 6, for forensic casework. *J Forensic Sci*. 2003 Jan;48(1):93-103.
- Solomon FF, Hauser DJ, Nehwadowich W. Final Report: Influence of CODIS DNA Testing on the Arrest and Prosecution of Burglary and Sexual Assault Cases in New York City: An Exploratory Study. New York City Criminal Justice Agency, Inc; 2011 Jun.
- Tsukada K, Asamura, H; Ota, M; Kobayashi, K; Fukushima, H. Sperm DNA extraction from mixed stains using the Differex™ System. *Int Congr Ser*. 2006;1288:700–703.
- Turrina S, Caratti S, De Leo D. Evaluation of PowerPlex® Fusion System on samples from forensic casework. *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series*.2013;4:210-211.

- Valgren C, Edenberger E. Evaluation of the Differex™ System. *Forensic Sci Int Genet.* 2008 Ago;1:78-79.
- Vargas JD. Familiares ou desconhecidos? A relação entre os protagonistas do estupro no fluxo do Sistema de Justiça Criminal. *Rev. bras. Ci. Soc.* 1999;14(40):63-82.
- Vargas JD. Padrões do estupro no fluxo do sistema de justiça criminal em Campinas, São Paulo. *Rev. katálysis.* 2008;11(2).
- Vuichard S, Borer U, Bottinelli M, Cossu C, Malik N, Meier V, Gehrig C, Sulzer A, Morerod M e Castella V. Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a Swiss collaborative study. *Invest Genet.* 2011;2:11.
- Woodhams J, Labuschagne G. South African serial rapists: the offenders, their victims, and their offenses. *Sex Abuse.* 2012 Dec;24(6):544-574.
- Yoshida K, Sekiguchi K, Mizuno N, Kasai K, Sakai I, Sato H, et al. The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Sci Int.* 1995 Out;72:25–33.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Autorização de Coleta Padrão



G O V E R N O D O E S T A D O
R I O G R A N D E D O S U L
SECRETARIA DA SEGURANÇA PÚBLICA
INSTITUTO-GERAL DE PERÍCIAS



Eu (**nome do periciado**), _____, portador do documento de identificação no. _____, expedido por _____ em _____, declaro que:

SIM <input type="checkbox"/>	NÃO <input type="checkbox"/>	Autorizo de livre e espontânea vontade a coleta de material biológico para a realização de exame pericial de identificação genética (exame de DNA) visando ao confronto de perfis genéticos para fins de apuração criminal.
SIM <input type="checkbox"/>	NÃO <input type="checkbox"/>	Concordo que meu perfil genético seja inserido em banco de dados de perfis genéticos.
SIM <input type="checkbox"/>	NÃO <input type="checkbox"/>	Autorizo que minha amostra seja utilizada em estudos científicos, de forma anônima.
SIM <input type="checkbox"/>	NÃO <input type="checkbox"/>	Possuo irmão gêmeo univitelínico (idêntico).
SIM <input type="checkbox"/>	NÃO <input type="checkbox"/>	Fui submetido a transplante de medula óssea nos últimos 90 dias.
SIM <input type="checkbox"/>	NÃO <input type="checkbox"/>	Fui submetido à transfusão sanguínea nos últimos 30 dias.

Estou ciente que os procedimentos de coleta não causam riscos à saúde humana e que as análises realizadas não revelam características físicas ou comportamentais das pessoas, exceto determinação de gênero (feminino ou masculino), consoante aos princípios contidos nos textos da Declaração Universal do Genoma Humano e dos Direitos Humanos de 1997 e da Declaração Internacional de Dados Genéticos de 2004, da UNESCO.

Assinatura do periciado ou responsável

Responsável (no caso de menores de 18 anos ou incapazes):

Nome completo: _____

Documento identidade: _____ Vínculo com o periciado: _____

Testemunha (autoridade acompanhando os custodiados ou os indivíduos sem documentação oficial):

Nome completo: _____

Documento identidade: _____

Assinatura: _____

ANEXO B – Protocolo de extração FTA® utilizado para amostras de referência.

EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE EM CARTÕES “FTA”

DATA: _____ Primeiro Responsável: _____ Segundo Responsável: _____

Amostra	Descrição	Localização	Perito

MATERIAL NECESSÁRIO

Lâmina de bisturi

Microtubo de 0,5 mL

FTA *Purification Reagent*

- TE⁻⁴ : 10mM Tris-HCL – 0,1 mM EDTA, pH 8,0

PROCEDIMENTO

- Cortar a amostra de sangue que se encontra no cartão (3mm) com estilete, colocar direto no microtubo. A quantidade de cortes é proporcional ao número de ampliações que se deseja fazer.
- Adicionar 200µL de FTA *purification reagent*, vortex, 1 a 2 s, baixa rotação.
- Deixar repousar por 5 min., à temperatura ambiente, na metade deste tempo vortex novamente.
- Remover o sobrenadante.
- Repetir o passo 2, por duas vezes, totalizando 3 lavagens.
- Adicionar 200µL de TE⁻⁴, vortex, 1 a 2s, baixa rotação.
- Repousar por 5min à temperatura ambiente, na metade deste tempo vortex novamente.
- Repetir o passo 6 .
- Remover o sobrenadante e deixar no banho seco a 60°C por 30 min ou 1h em à temperatura ambiente, ou até a total evaporação do TE⁻⁴.

- DNA extraído.

ANEXO C – Protocolo de extração orgânica.

EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO ORGÂNICO – FINAL MICROCON
(manchas de sangue, swabs, tecidos, pêlos, etc).

DATA: ___/___/___ Primeiro Responsável: _____ Segundo Responsável: _____

H ₂ O	Amostra	Descrição	Localização

MATERIAL NECESSÁRIO:

Proteinase K: fabricante/lote – 20 mg/mL

DTT: fabricante/lote – 1 mol/L

Tampão de extração de manchas (SEB):

10 mM Tris-HCl, - 100 mM NaCl - 10 mM EDTA - 2% SDS, pH 8

TE⁺: 10 mM Tris-HCl - 0,1 mM EDTA, pH 8,0

Tris / EDTA / NaCl:

10mM Tris-HCl - 1 mM EDTA - 100mM NaCl, pH 8

Clorofane: fenol /clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1 - v/v)

PROCEDIMENTOS:

- Adicionar 300µL de SEB, 24µL de Proteinase K e 48 µL de DTT – vortex e spin por 10 s.
- Temperatura / tempo de incubação: 56°C / 18 - 24h (OBS: Colocar mais 24µL de PK 1 a 2 horas antes de iniciar o restante dos procedimentos).
- Adicionar 500µL de clorofane a cada amostra – vortex;
- Centrifugar por 7 minutos a 9700 g.
- Transferir a fase aquosa para as unidades concentradoras de Microcon 100, contendo 100µL de H₂O ultra pura.
- Centrifugar a 700 g, até que o volume tenha sido filtrado.
- Adicionar 400µL (ou 2x de 200µL) de H₂O ultra pura à unidade concentradora de Microcon 100 e centrifugar a 700 g até que o volume tenha sido filtrado.
- Adicionar 50µL de H₂O sobre o Microcon para recuperar o DNA extraído (OBS. Neste momento troca-se de microtubo e vira-se a membrana concentradora).
- Recuperar por 7 min a 1000 g
- Armazenar a -20°C para análises posteriores.

ANEXO D - Protocolo de extração diferencial.

EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO ORGÂNICO DIFERENCIAL
(Suabes e lâminas vaginais/anais e outros vestígios contendo espermatozóides)

DATA: _____ Primeiro Responsável: _____ Segundo Responsável: _____

Amostra	Descrição	Localização	Perito

MATERIAL NECESSÁRIO:

Proteinase K: 20 mg/mL	DTT: 1 mol/L
Sarkosil 20%	H ₂ O
TE ⁻⁴ : 10 mM Tris-HCl - 0,1 mM EDTA, pH 8,0	Clorofane: fenol /clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1 - v/v)
Tris / EDTA / NaCl: 10mM Tris-HCl - 1 mM EDTA - 100mM NaCl, pH 8	
Tampão de Lavagem de Esperma: 10mM Tris-HCl - 10 mM EDTA - 50mM NaCl - 2% SDS, pH7,5.	

PROCEDIMENTOS:

Adicionar 500 µL de Tampão de extração FNE, vortex 10 seg.	Adicionar 400 µL de clorofane às frações FNE e FE de cada amostra, vortex.
Temperatura/tempo de incubação: 37°C / 2 horas.	Centrifugar 5 min a 12000 rpm.
INÍCIO: _____	Transferir a fase aquosa para microtubo de 1,5 mL.
TÉRMINO: _____	Adicionar 1000 µL de álcool absoluto.
Retirar o suporte do vestígio (<i>swab</i> , tecido, etc) com cesta ou suabe preso à tampa + spin, para retirar TODO o líquido do suporte.	Misturar suavemente por inversão.
Centrifugar 5 min a 12000 rpm.	Temperatura/tempo de incubação: -20°C (freezer)/ no mínimo 1 hora (ou overnight para maximizar precipitação de DNA).
Transferir o sobrenadante para microtubo estéril (FNE) e guardar na geladeira até o passo 12.	INÍCIO: _____ TÉRMINO: _____
Ao microtubo inicial que contém o pellet (FE), adicionar 500 µL de Tampão de lavagem de esperma, vortex.	Centrifugar 15 min a 12000rpm.
Centrifugar 5 min a 12000 rpm.	Desprezar o sobrenadante por inversão.
Remover e descartar o sobrenadante.	Adicionar 500 µL de álcool 70% gelado sem mexer no pellet.
Repetir passos 6, 7 e 8 até um total de 3 lavagens. Em caso de pouco material masculino, pode-se lavar 1-2 vezes.	Centrifugar 5 min a 12000rpm.
Adicionar 365 µL de Tampão de extração FE, vortex 10 seg.	Descartar o sobrenadante por inversão.
Temperatura/tempo de incubação: 56°C / no mínimo 2 horas	Aguardar secagem em banho seco e ressuspender em 50 µL de água de injeção. INÍCIO: _____
	TÉRMINO: _____

TAMPÃO FNE	Nº amostras	TOTAL	TAMPÃO FE	Nº amostras	TOTAL
Tris / EDTA / NaCl - 400 µL	X	= µL	Tris / EDTA / NaCl - 150 µL	X	= µL
Sarkosil 20% - 25 µL	X	= µL	Sarkosil 20% - 50 µL	X	= µL
H ₂ O - 75 µL	X	= µL	H ₂ O - 150 µL	X	= µL
Proteinase K - 7,5 µL	X	= µL	Proteinase K - 7,5 µL	X	= µL
			DTT - 7 µL	X	= µL