

286
AAA



**Laudo
de Investigação Genética
de Identidade pelo Estudo
Direto do DNA**

GENE/SP

Pro Matre Paulista
Al. Joaquim Eugênio de Lima 383
01403 001 São Paulo/SP
Fones (011) 288 0622 e 287 2233 r.240
Fax (011) 288 0622

GENE/MG

Edifício Work Center
Av. Afonso Pena 3111 9º andar
30130 909 Belo Horizonte/MG
Fone (031) 227 3496
Fax (031) 227 3792

GENE/ES

Clínica Dr. Leo Siqueira
Rua Fortunato Ramos 25
29055 290 Vitória/ES
Fone/Fax (027) 227 6226

2
287
AA.



1. Preâmbulo

Aos 10 dias de maio de 1993, nesta cidade de Belo Horizonte, o infra-assinado perito, Prof. Dr. Sérgio Danilo Junho Pena, médico geneticista, Diretor do Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais (GENE/MG), e Professor Titular do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, iniciou a perícia genética de identificação, recebendo as seguintes peças de evidência:

1. Cinco dentes, uma mandíbula, uma clavícula, um ílaco, um fêmur e duas costelas retirados do cadáver registrado no livro IML sob o nº 340/93.
2. Sangue do Sr. João Bossi, colhido no dia 7 de maio de 1993 pela Dra. Maria Regina Sawaya Rolim, Química Legal, documento de identidade profissional nº 3073, emitido pelo Instituto de Identificação do Paraná.
3. Sangue da Sra. Paulina Rudy Bossi, colhido no dia 7 de maio de 1993 pela Dra. Maria Regina Sawaya Rolim, Química Legal, documento de identidade profissional nº 3073, emitido pelo Instituto de Identificação do Paraná.

As amostras foram trazidas ao Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais pessoalmente pelas Doutoras Maria Regina Sawaya Rolim e Maria Cristina Sawaya Novak.

GENE/SP

Pro Matre Paulista
Al. Joaquim Eugênio de Lima 383
01403 001 São Paulo/SP
Fones (011) 288 0622 e 287 2233 r.240
Fax (011) 288 0622

GENE/MG

Edifício Work Center
Av. Afonso Pena 3111 9º andar
30130 909 Belo Horizonte/MG
Fone (031) 227 3496
Fax (031) 227 3792

GENE/ES

Clínica Dr. Leo Siqueira
Rua Fortunato Ramos 25
29055 290 Vitória/ES
Fone/Fax (027) 227 6226



2
288
AM.

2) Objetivo da Perícia

O objetivo da perícia era estabelecer pelo estudo comparativo dos dentes e ossos, com os sangues de João Bossi e Paulina Rudy Bossi, se o cadáver era de um filho do casal, Leandro Bossi, desaparecido.

3) Realização da Perícia

Foram extraídas e processadas em dias diferentes, duas preparações independentes do DNA das células do sangue periférico de Paulina Rudy Bossi e de João Bossi. Este DNA provou ser de alto peso molecular e adequado para análise. Foram também extraídas, por várias metodologias, amostras de DNA de vários dentes e ossos encaminhados. Para manter confidencial a identidade das pessoas testadas, cada amostra de DNA recebeu um número código, como se segue:

Paulina Rudy Bossi	No. 12461
João Bossi	No. 12469
DNA do cadáver	No. 12465

3.1 - Tentativa de identificação genética do cadáver pelo DNA mitocondrial

O DNA mitocondrial humano é um pequeno DNA circular extra-nuclear presente em cerca de 10.000 cópias por célula. Este DNA tem uma série de características genéticas peculiares, destacando-se o fato dele ser altamente variável e ter herança puramente materna. Em outras palavras, todo o DNA mitocondrial de um indivíduo vem de sua mãe, sem nenhuma contribuição paterna. Assim, todos irmãos tem o mesmo DNA mitocondrial, que é idêntico ao de sua mãe, sua avó materna etc. Por outro lado, sua evolução rápida faz com que cada linhagem matrilinea seja essencialmente única, o que permite a identificação. Finalmente, por ser naturalmente amplificado nas células e ter aparentemente uma resistência maior à degradação, o DNA mitocondrial é um objeto de estudo ideal em casos de criminalística, onde somos obrigados a trabalhar com quantidades mínimas de DNA degradado.

GENE/SP
Pro Matre Paulista
Al. Joaquim Eugênio de Lima 383
01403 001 São Paulo/SP
Fones (011) 288 0622 e 287 2233 r.240
Fax (011) 288 0622

GENE/MG
Edifício Work Center
Av. Afonso Pena 3111 9º andar
30130 909 Belo Horizonte/MG
Fone (031) 227 3496
Fax (031) 227 3792

GENE/ES
Clínica Dr. Leo Siqueira
Rua Fortunato Ramos 25
29055 290 Vitória/ES
Fone/Fax (027) 227 6226

289
871



Nós no GENE desenvolvemos uma nova técnica, chamada LSSP-PCR (Low-Stringency Single Specific Primer PCR) e baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica permite-nos detectar mutações em fragmentos de DNA com tamanho de genes. Dois artigos com a descrição da técnica já foram aceitos para publicação e estão no prelo (Pena, S.D.J., Barreto, G., Vago, A.R., De Marco, L., Reinach, F.C., Dias Neto, E. e Simpson, A.J.G. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency (LSSP-PCR). Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. , No Prelo. e Pena, S.D.J., Barreto, G., Ginther, C.L. e Simpson, A.J.G. Mitochondrial D-loop "signatures" with low-stringency single specific primer PCR (LSSP-PCR): a novel approach to identity testing. Proceedings of the Promega International Symposium of Human Identification, No Prelo). Um fragmento purificado de DNA mitocondrial é submetido à PCR usando um único oligonucleotídeo iniciador complementar a uma das extremidades do fragmento. Com esta PCR produz-se um conjunto extremamente complexo de produtos que quando separados por eletroforese constituem uma "assinatura" do gene, a qual reflete a sequência do mesmo. Em pares mãe-filho esta assinatura do DNA mitocondrial tem forçosamente de ser sempre igual. Em indivíduos não-relacionados, ela é sempre diferente. Assim, esta técnica é muito poderosa para identificação de cadáveres pela comparação com uma possível mãe ou um possível irmão ou irmã.

Os DNAs obtidos de ossos e dentes do cadáver foram submetidos a ampliações utilizando vários pares de iniciadores específicos para segmentos da alça D (região controle) do DNA mitocondrial. Estes fragmentos foram então submetidos a LSSP-PCR, com intuito de se fazer um teste de identidade genética com o DNA mitocondrial de Paulina Rudy Bossi. Obtivemos resultados reprodutíveis com amplificação da região do DNA mitocondrial que estende-se do nucleotídeo 15996 até 16347. Os resultados consistentemente mostraram diferenças significativas entre o perfil de bandas ("assinatura") do cadáver e de Paulina Rudy Bossi. Um exemplo disso pode ser visto na figura 1.

GENE/SP

Pro Matre Paulista
 Al. Joaquim Eugênio de Lima 383
 01403 001 São Paulo/SP
 Fones (011) 288 0622 e 287 2233 r.240

GENE/MG

Edifício Work Center
 Av. Afonso Pena 3111 9º andar
 30130 909 Belo Horizonte/MG
 Fone (031) 227 3496

GENE/ES

Clinica Dr. Leo Siqueira
 Rua Fortunato Ramos 25
 29055 290 Vitória/ES

290
AA

12465

12461 Dente 1 Osso 1 Osso 2

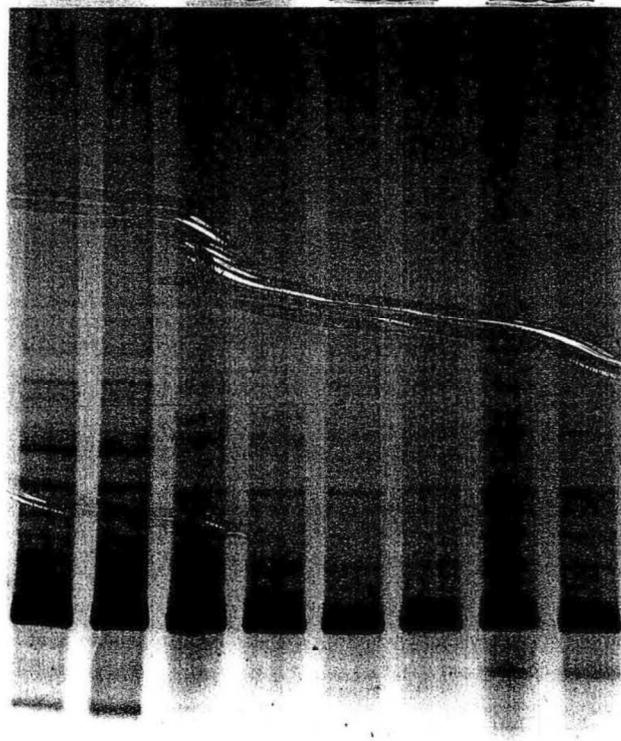


Figura 1 - Comparação entre as padrões de LSSP-PCR de Paulina Rudy Bossi e de três amostras (duas preparações de DNA de osso e uma de dente) do cadáver. As assinaturas dos dentes e ossos são basicamente idênticas entre si.

GENE/SP

Pro Matre Paulista
Al. Joaquim Eugênio de Lima 383
01403 001 São Paulo/SP
Fones (011) 288 0622 e 287 2233 r.240
Fax (011) 288 0622

GENE/MG

Edifício Work Center
Av. Afonso Pena 3111 9º andar
30130 909 Belo Horizonte/MG
Fone (031) 227 3496
Fax (031) 227 3792

GENE/ES

Clínica Dr. Leo Siqueira
Rua Fortunato Ramos 25
29055 290 Vitória/ES
Fone/Fax (027) 227 6226

291
041

3.2 - Tentativa de identificação genética do cadáver por locos polimórficos nucleares

Utilizando-se a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), o DNA obtido de ossos e dentes do cadáver, foi submetido a inúmeros estudos com uma grande bateria de locos polimórficos: DQ α , os minissatélites ApoB, D1S80 e D17S30 e os microsatélites D12S67, vWF1, vWF2, SE33 e Y-27H39. Houve uma dificuldade muito grande na obtenção de padrões consistentes e reprodutíveis de PCR à partir das preparações de DNA do cadáver. Conseguimos resultados confiáveis com apenas dois sistemas polimórficos. Os resultados estão mostrados na tabela abaixo.

Loco	12461	12465	12469
DQ α	1.1 1.3	1.1 2	1.1 4
D12S67	4 5	2 4	4 5
Y-27H39	-	-	B

Estes resultados não são compatíveis com a paternidade do casal João Bossi e Paulina Rudy Bossi com relação ao cadáver estudado. Os resultados obtidos com os sistemas D12S67/Y-27H39 e DQ α estão mostrados nas Figuras 2 e 3 respectivamente.

GENE/SP

Pro Matre Paulista
Al. Joaquim Eugênio de Lima 383
01403-001 São Paulo/SP
Fones (011) 288 0622 e 287 2.33 r.240
Fax (011) 288 0622

GENE/MG

Edifício Work Center
Av. Afonso Pena 3111 9º andar
30130-909 Belo Horizonte/MG
Fone (031) 227 3496
Fax (031) 227 3792

GENE/ES

Clinica Dr. Leo Siqueira
Rua Fortunato Ramos 25
29055-290 Vitória/ES
Fone/Fax (027) 227 6226

29a2
#

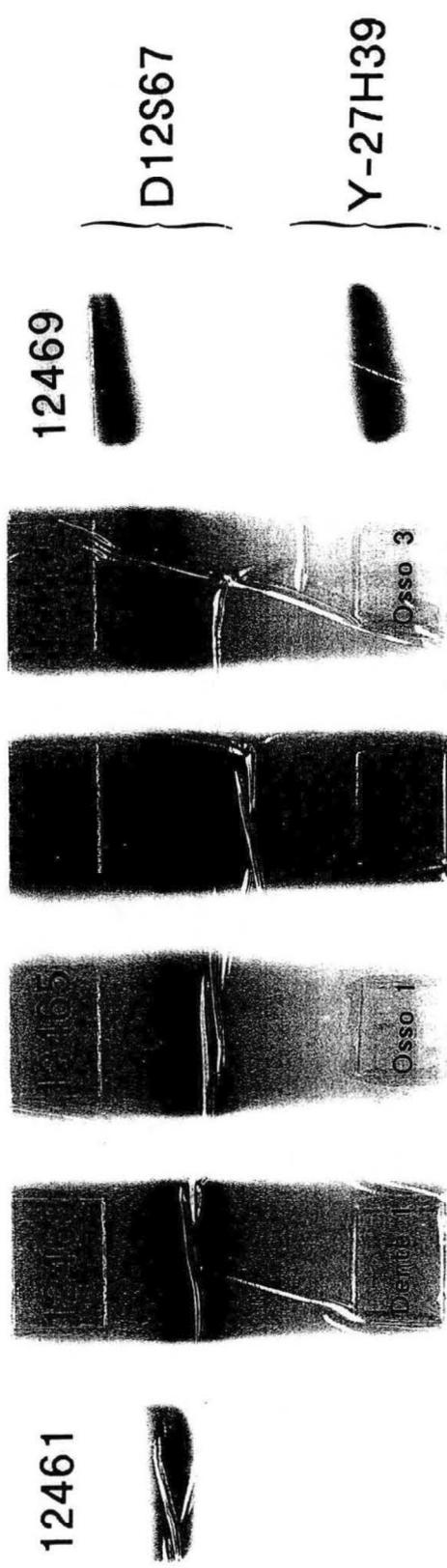


Figura 2 - Resultados obtidos com os sistemas D12S67 e Y-27H39. Note que não houve amplificação de Y-27H39 em 12465 mesmo havendo resultados com D12S67.

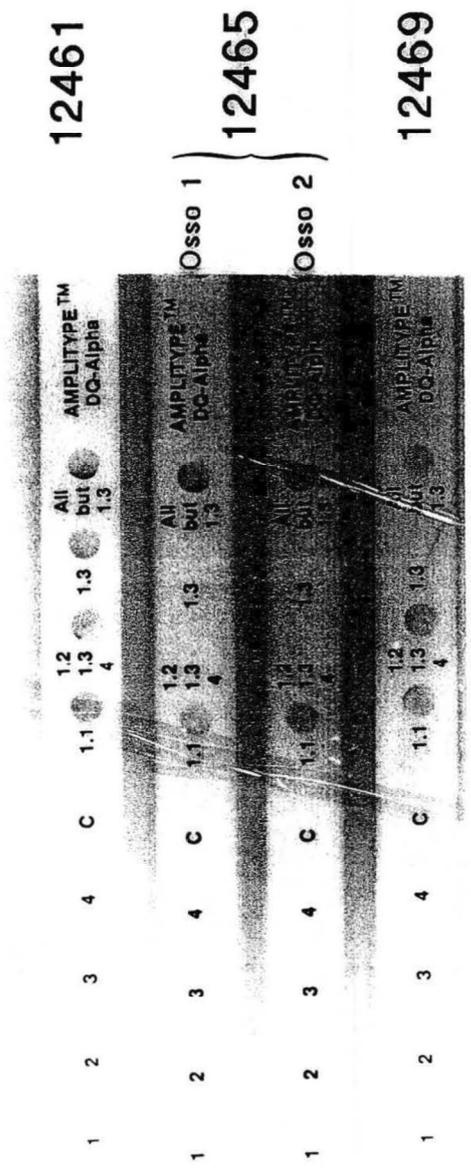


Figura 3 - Resultados obtidos com o sistema DQα.

[Signature]
GENE/SP
 Pro Matre Paulista
 Al. Joaquim Eugênio de Lima 383
 01403 001 São Paulo/SP
 Fones (011) 288 0622 e 287 2233 r.240
 Fax (011) 288 0622

GENE/MG
 Edifício Work Center
 Av. Afonso Pena 3111 9º andar
 30130 909 Belo Horizonte/MG
 Fone (031) 227 3496
 Fax (031) 227 3792

GENE/ES
 Clínica Dr. Leo Siqueira
 Rua Fortunato Ramos 25
 29055 290 Vitória/ES
 Fone/Fax (027) 227 6226

293
A1.

3.3 - Determinação do sexo do cadáver

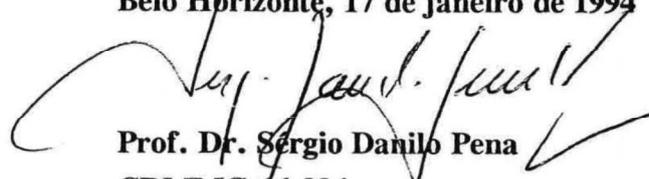
Nos estudos de PCR com os microssatélites D12S67 e Y-27H39 não houve amplificação de Y-27H39 em 12465 mesmo havendo resultados claros com D12S67, como demonstrado na Figura 2. Este resultado era muito sugestivo de que o cadáver sendo estudado era do sexo feminino, já que o loco Y-27H39 está localizado no cromossomo Y, que só é encontrado em homens. Para testar de maneira mais rigorosa esta sugestão, nós realizamos a amplificação das preparações de osso e dente do cadáver de um fragmento da região DYZ1, que está repetida de 500 a 10.000 vezes em homens e que assim nos dá muito maior sensibilidade que Y-27H39. Novamente não houve amplificação nas amostras do cadáver estudado.

4) Conclusões

1. Em primeiro lugar deve ser ressaltado que estudos de identidade feitos a partir de DNA obtido de dentes e ossos são procedimentos delicados que podem ser influenciados por fatores variados, inclusive contaminação das amostras com DNA extrínscico, o que pode levar a falsas exclusões. No GENE são tomadas enormes precauções para evitar contaminações, inclusive com uso de várias preparações de DNA de dentes e ossos distintos. Mesmo assim, resultados negativos, ou seja, nos quais não há correspondência entre os achados com o DNA do cadáver e o DNA das pessoas usadas como referência para a identificação, devem sempre ser tomados com muito maior cautela do que resultados em que a identificação é positiva.

2. Tendo em vista as considerações acima, os achados da perícia não são compatíveis com a paternidade do casal João Bossi e Paulina Rudy Bossi com relação ao cadáver estudado. Assim, concluímos não tratar-se do cadáver de Leandro Bossi. Além disso, os estudos são altamente sugestivos de tratar-se do cadáver de uma criança do sexo feminino.

Belo Horizonte, 17 de janeiro de 1994



Prof. Dr. Sérgio Danilo Pena
CRMMG 14.894