

O DNA como (Única) Testemunha em Determinação de Paternidade

Sérgio D.J. Pena

Presidente do Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais (GENE) e Professor Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG

A necessidade de se estabelecer relações de paternidade freqüentemente surge em contextos legais, sociais ou médicos. Como a concepção ocorre no interior do corpo da mulher e não admite testemunhas, a única maneira de resolver efetivamente o problema é através de testes genéticos. Em especial, os testes em DNA nos permitem resolver disputas de paternidade com certeza em praticamente todos os casos - o que pode ser conseguido através do uso apropriado de sondas multilocais de minissatélites, baterias de sondas unilocais ou testes por PCR em locos de minissatélites e microssatélites. As diferenças de eficiência dessas diferentes técnicas podem ser compensadas mediante o ajuste do número de testes realizados. Neste artigo, fazemos uma breve revisão discutindo as vantagens e desvantagens de cada uma das três metodologias mais utilizadas para a determinação de paternidade pelo DNA. Nesta base, propomos critérios que podem ser empregados para avaliar a confiabilidade de laboratórios de determinação de paternidade. Finalmente, enfatizamos que a perícia de determinação de paternidade é inalienavelmente um ato médico, alicerçado tanto em capacitação ética quanto técnica - na qual a atuação desavisada de profissionais inadequadamente formados nos aspectos éticos e médico-legais da determinação de paternidade pode levar a resultados desastrosos.

UNITERMOS -Paternidade, DNA, minissatélites, microssatélites, polimorfismos

O problema

A incerteza da paternidade é tão antiga quanto a humanidade. A concepção ocorre no interior do corpo da mulher e, assim, não admite testemunhas. Em consequência, embora a mulher esteja sempre 100% certa de que as crianças por ela geradas são biologicamente suas (com exceção da possibilidade de trocas no berçário, um fenômeno novo na história da humanidade, já que no passado virtualmente todos os partos eram domésticos) o homem tem muitas vezes de lidar com a incerteza da paternidade (entretanto, na grande maioria dos casos essa incerteza não é consciente). Como reza o dito popular: "os filhos de minhas filhas meus netos são; os filhos de meus filhos serão ou não?".

Alguns autores acreditam que a incerteza da paternidade é um dos fatores que evolucionariamente contribuiu para moldar padrões de conduta masculinos na sociedade, já que, no passado, os homens adaptativamente assumiam condutas que maximizassem a probabilidade de sua paternidade e minimizassem a chance de investirem recursos em crianças que fossem filhos biológicos de outros homens (1). Por exemplo, estudos multiculturais realizados em 186 diferentes grupos étnicos mostraram que o adultério feminino, junto com a esterilidade conjugal, é a causa mais comum de dissolução de casamentos (2). Outras evidências vêm dos estudos sobre os ciúmes maritais, que são despertados no homem principalmente pela suspeita, observação ou descoberta de infidelidade sexual da mulher (eventos que comprometem a certeza de paternidade), enquanto na mulher são evocados preponderantemente por infidelidade emocional (3).

De qualquer maneira, há evidências claras que apontam para uma incidência significativa de não-paternidade intramarital nas sociedades humanas. Uma taxa de 10% é freqüentemente citada em tratados de genética. Recentemente, uma meta-análise do tópico foi realizada por Macintyre e Sooman (4), que encontraram na literatura estudos com taxas de não-paternidade intramarital variando de 2% até 30% e enfatizaram o fato de que, como a maioria das estimativas eram indiretas, tornava-se impossível aceitar ou refutar a taxa freqüentemente citada de 10%. Baker e Bellis (5) também citam estudos com uma faixa de 9-30%. Por outro lado, outros diversos autores sugerem que 10% é um exagero e que as verdadeiras taxas situam-se em torno de 2-4% (6,7,8). A verdade é que ninguém sabe exatamente qual esse percentual, nem mesmo as próprias mães. A experiência desenvolvida pelo Núcleo de Genética Médica (GENE) com milhares de casos - e também a de praticamente todos os laboratórios que realizam testes de paternidade nos Estados Unidos e Europa - é que em aproximadamente 25% dos casos o indigitado possível pai é excluído da paternidade - isto quer dizer que as próprias mães se enganaram.

Por que tantas incertezas? Na verdade, embora saibamos que a concepção só pode ocorrer na época da ovulação, o número de dias férteis antes ou depois de sua ocorrência é incerto. Um estudo recente, com metodologia

cientificamente confiável, mostrou que praticamente todas as gravidezes podiam ser atribuídas a relações sexuais que ocorriam nos seis dias que precediam a ovulação, um período relativamente grande (9). Nesse aspecto, um fenômeno interessante é o da superfecundação, ou seja, a produção de gêmeos por fertilização de dois óvulos em coitos diferentes. Estima-se que este fenômeno ocorra em quase 10% dos gêmeos dizigóticos (10). Mais peculiar ainda é o fenômeno de superfecundação heteropaternal, que gera gêmeos com pais diferentes (veja, por exemplo, 11,12,13). A estimativa é que 0,25% dos gêmeos dizigóticos nascidos de mulheres brancas nos Estados Unidos tenham pais diferentes (10). Entre gêmeos dizigóticos envolvidos em perícias judiciais de paternidade, 2,4% tinham pais diferentes (13). Embora a ovulação aconteça mais freqüentemente no meio do ciclo menstrual, alie-se a estas incertezas o fato de que ela pode eventualmente ocorrer durante qualquer outra parte do mesmo. Em última análise, nenhuma mulher que tenha mantido relações sexuais com mais de um homem durante o ciclo menstrual em que engravidou (ou mesmo, considerando as freqüentes incertezas sobre a idade gestacional exata, em ciclos adjacentes) pode ter certeza absoluta de quem é o pai da criança.

A posição da lei

No Brasil, o problema de paternidade é muito sério pois representa um enorme ônus econômico, social e emocional. Segundo a Estatística do Registro Civil de 1988, publicada pelo IBGE, 31,1% das crianças nascidas em 1988 e registradas naquele ano eram filhas de mãe solteira. Se considerarmos que no Brasil nascem em cada 12 meses pelo menos 3 milhões de crianças, temos no mínimo 1 milhão de nascimentos ilegítimos por ano. Entretanto, não dispomos da informação de quantos destes casos tornam-se disputas jurídicas de paternidade. Nos Estados Unidos, sabemos que mais de 120.000 testes judiciais de paternidade foram realizados em 1990, e esse número tem rapidamente aumentado.

A necessidade de se estabelecer relações de paternidade freqüentemente acaba na Justiça. No Brasil, as prescrições jurídicas para lidar com o problema estão definidas no Código Civil (datado de 1916) e no Código de Processo Civil. O que dizem eles? Vamos citar somente alguns artigos mais relevantes: Código Civil, (Lei nº 3.071 de 1º de janeiro de 1916) - Capítulo IV - DO RE-CONHECIMENTO DOS FILHOS ILEGÍTIMOS

- Artigo 363

Os filhos ilegítimos de pessoas que não caibam no art.183, incisos I e IV, têm ação contra os pais, ou seus herdeiros, para demandar o reconhecimento da filiação:

- I. - se ao tempo da concepção a mãe estava concubina com o pretendido pai;
- II. - se a concepção do filho realmente coincidir com o rapto da mãe pelo suposto pai; ou as relações sexuais com ela;
- III. - se existir escrito daquele a quem se atribui a paternidade, reconhecendo-a expressamente.

Segundo Alem (14), a enumeração deste artigo é taxativa, e não exemplificativa, não admitindo, portanto, aplicação analógica ou interpretação extensiva.

O Código de Processo Civil (15) rege todo o ritual da Ação de Paternidade. A petição inicial é feita de acordo com os requisitos estampados nos arts. 282 e 283 (que não vamos transcrever aqui). Proposta a ação, o réu pode apresentar nos prazos legais uma contestação de acordo com os arts. 297-302. Neste estágio, dois argumentos são freqüentemente invocados e vale a pena serem mencionados. O primeiro, muito utilizado, é a *exceptio plurium concubentium*, ou seja, a argumentação de que a mãe era sexualmente promíscua na época da concepção, não podendo então atribuir ao réu, com certeza, a paternidade. Essa argumentação, embora cientificamente correta, tem freqüentemente o efeito de transformar o processo de Investigação de Paternidade em um julgamento moral da mãe (essa linha de argumentação, felizmente, tornou-se inadequada frente à certeza apresentada pelas provas periciais dos testes em DNA; ver abaixo). O segundo, é de impossibilidade de paternidade por impotência sexual, que em teoria pode ser instrumental (por falta de ereção, dita *coeundi*) ou esterilidade (impotência *generandi*). Com relação a esse último tópico, do ponto de vista médico, mesmo a comprovação de azoospermia ou oligospermia severa não podem ser consideradas absolutas, já que há relatos de concepção comprovada mesmo nessas situações teoricamente impossíveis (16,17,18). Vencidas essas etapas o juiz passa, então, à coleta das provas testemunhais e periciais que vão dar-lhe os subsídios necessários para prolatar uma sentença.

Com relação à prova testemunhal, o Código de Processo Civil é bastante claro: "A prova testemunhal é sempre admissível, não dispondo a lei de modo diverso." (Art. 400). Entretanto, como esperamos ter demonstrado pela exposição acima, acreditamos que em determinação de paternidade a prova testemunhal deva ser avaliada *cum grano salis*, já que, como anteriormente mencionado, a concepção ocorre no interior do corpo da mulher e, assim, não admite testemunhas. Desse modo, a única maneira realmente eficaz de se comprovar a paternidade é através da perícia técnica, mais especificamente pelos exames em DNA.

A solução

Nos últimos anos, com os avanços do Projeto Genoma Humano foi definitivamente comprovado que, com exceção dos gêmeos monozigóticos (univitelinos), todos os seres humanos diferem em sua constituição genética, que é absolutamente única (19). Em outras palavras, cada ser humano representa um experimento evolucionário singular -jamais houve e jamais haverá um outro indivíduo igual. Essa individualidade, que certamente dá uma dimensão de dignidade a cada vida humana, pode também ser aplicada de maneira prática para realizar, entre outros:

- determinação de paternidade e de outros vínculos genéticos;
- identificação de criminosos e vítimas;
- determinação de zigosidade de gêmeos;
- tipagem para transplantes de órgãos;
- aconselhamento genético e diagnóstico pré-natal de doenças genéticas.

A individualidade genética humana pode ser estudada ao nível do produto gênico (proteínas e enzimas), mas pode ser caracterizada com uma precisão infinitamente maior ao nível do DNA. Por exemplo, se fizermos a tipagem conjunta de grupos sanguíneos, HLA (locos A e B), enzimas eritrocitárias e proteínas séricas (total de aproximadamente 40 testes genéticos) podemos calcular que a probabilidade que dois indivíduos escolhidos ao acaso na população apresentem resultados idênticos é de 8×10^{-14} (que é muito menor que a recíproca da população mundial). Em determinação de paternidade isto corresponde a um poder de exclusão de 99,97% (o poder de exclusão denota a capacidade de um sistema de testes excluir uma paternidade falsamente imputada). Por outro lado, pelo estudo do DNA com apenas duas sondas multilocais - F10 e DNF24, que usamos no Núcleo de Genética Médica (GENE) -, a probabilidade de identidade ao acaso cai para 8×10^{-16} e o poder de exclusão sobe consideravelmente para 99,99995%! (19,20,21).

A variabilidade humana em nível do DNA é enorme. Dois genomas humanos escolhidos ao acaso diferem aproximadamente em uma de cada 500 bases do DNA (nucleotídeos). Como o genoma humano tem 3×10^9 bases, isto implica em 6 milhões de diferenças! Certamente, essa enorme variação (polimorfismo) poderia ser completamente elucidada e caracterizada se fizéssemos o sequenciamento completo dos dois genomas sendo comparados, uma tarefa impraticável com a metodologia atual. Entretanto, isto não é necessário porque a abundância de variação é tal que a simples amostragem de um determinado número de regiões variáveis do DNA nos permite caracterizar confiavelmente a individualidade humana. Nos últimos anos foram desenvolvidas metodologias para estudar os polimorfismos de DNA tanto em nível de variação de seqüência quanto de tamanho. No último ano, inclusive, houve avanços enormes no desenvolvimento e utilização de "microchips de hibridização de DNA", metodologia essa que poderá tornar-se de escolha no futuro (22). Porém, muito mais prático e eficiente, hoje em dia, é o estudo de regiões de minissatélites e microssatélites do DNA (23). Estes são segmentos genômicos onde um tipo de seqüência de DNA se repete várias vezes, como se estivesse gaguejando (Figura 1). Se a seqüência repetitiva tem mais de 6 bases, falamos em minissatélites e se menos de 6 bases, em microssatélites. A chave do polimorfismo nestas regiões é que o número de repetições varia entre indivíduos e pode ser estudado com sondas de DNA ou com a chamada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Entraremos em maiores detalhes metodológicos mais adiante. O importante, aqui, é frisar a imagem de genomas humanos imensamente variáveis que podem ser abordados metodologicamente com tipos de exames diferentes e complementares. As várias técnicas que já foram desenvolvidas para estudo de polimorfismos de DNA possuem eficiência e especializações diferentes, formando assim um verdadeiro cardápio, no qual os cientistas e laboratórios podem escolher o método mais adequado para solucionar o problema em mãos. Por isso, a expressão correta é "testes em DNA" e não "teste de DNA".

Minissatélites e Microsatélites

1) No genoma humano há milhares de regiões diferentes (locos) chamadas minissatélites onde uma determinada sequência de DNA se repete várias vezes, como em um retrão. Se esta sequência é pequena (< 6 bases), estas repetições são chamadas de microsatélites.



2) Os minissatélites e microsatélites têm variações (polimorfismo) no número de repetições. Cada variante é chamada um alelo. Em cada ser humano encontramos dois alelos, um paterno e um materno.



Alelo com 3 repetições
Alelo com 4 repetições
Alelo com 5 repetições
Alelo com 6 repetições, etc.

3) No laboratório são usadas técnicas de engenharia genética que permitem visualizar os alelos de tamanhos diferentes, como bandas em um gel. Isto pode ser conseguido pelas sondas de DNA ou pela PCR. Com as sondas multilocais podemos visualizar simultaneamente vários minissatélites. A PCR só é aplicável a microsatélites e minissatélites pequenos, que são menos variáveis e, assim, menos informativos.



Gel

Fundamentos teóricos dos testes de paternidade

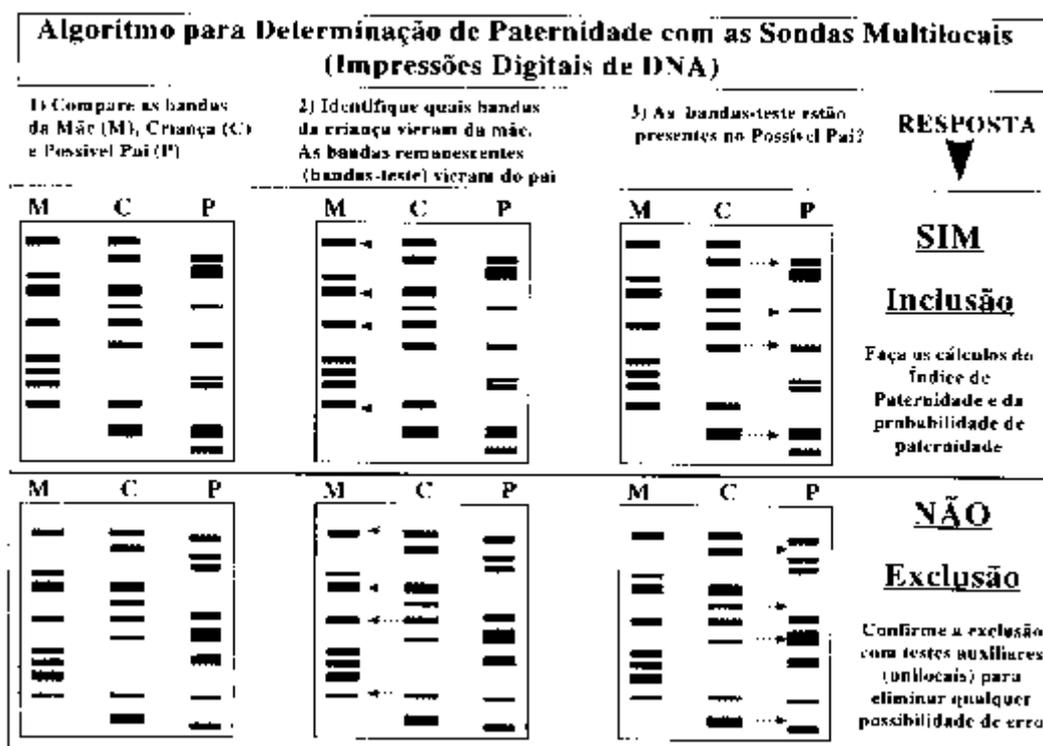
Exclusões de paternidade são logicamente incontestáveis, enquanto a prova da paternidade depende de inferências estatísticas baseadas na ausência de uma exclusão. Esta lógica foi extensamente discutida e generalizada por Karl Popper, um filósofo da ciência (24). Segundo Popper, há uma assimetria lógica entre verificação e falsificação. Hipóteses científicas podem ser refutadas, mas nunca podem ser 100% provadas por experimentação. O poder de exclusão dos testes em DNA utilizados em determinação de paternidade pode ser medido pela probabilidade média de exclusão (PE), ou seja, a probabilidade de se excluir um indivíduo qualquer que tenha sido falsamente acusado, através de uma determinada bateria de exames. Isto forma a base para o cálculo da seguinte probabilidade de paternidade: $1/(1-PE)$. Esta probabilidade é simples de calcular e depende somente das frequências alélicas da população em geral (25). Entretanto, para pares específicos mãe-filho, em alguns casos o alelo paterno obrigatório pode ser freqüente, enquanto em outras situações ele pode ser raro. É intuitivo entender que a ausência de exclusão na última situação será mais significativa que na primeira. Isto pode ser quantificado dividindo-se a verossimilhança ("probabilidade") de obter os resultados observados na hipótese do possível pai ser realmente o pai biológico (X) pela verossimilhança de obter os resultados na suposição que um outro indivíduo qualquer seja o pai verdadeiro (Y). Esta razão de verossimilhanças (X/Y), chamada Índice de Paternidade (IP), é uma maneira de quantificar a evidência encontrada em favor da paternidade biológica do possível pai. O Índice de Paternidade pode ser convertido para uma probabilidade posterior de paternidade com o Teorema de Bayes (25). Entretanto, o teorema nos força a ter de escolher uma probabilidade a priori, isto é, um valor subjetivo da chance de paternidade anterior ao teste, dado essencial para o cálculo de acordo com as regras do teorema. Probabilidades a priori constantes (0,5) têm sido consensualmente utilizadas em todo o mundo. Porém, em função dos altos valores obtidas rotineiramente para Índices de Paternidade com testes em DNA ($> 10^4$), a escolha da probabilidade a priori torna-se irrelevante na prática.

Testes de paternidade com sondas multilocais

Os locos polimórficos mais conhecidos no genoma humano são os minissatélites (23) ilustrados na Figura 1. Em 1985, Jeffreys e colaboradores (26,27) foram os primeiros a mostrar que sondas derivadas do gene da mioglobina humana (sondas 33.6 e 33.15) eram capazes de se hibridizar simultaneamente com diversos locos de minissatélites, produzindo padrões de bandas complexos e específicos para cada indivíduo, que foram chamados de "impressões digitais de DNA" (23). Depois, outras sondas similares (sondas multilocais) foram descritas na literatura mundial, incluindo a F10, DNF24 e (CA)_n, que são utilizadas nas perícias médicas de determinação de paternidade do Núcleo de Genética Médica (GENE). A sonda F10, originalmente desenvolvida por nosso grupo de pesquisa na UFMG a partir de um gene do *Schistosoma mansoni* e, em seguida, adaptada para um procedimento não-radioativo com quimioluminescência, detecta de 15 a 20 fragmentos variáveis de DNA maiores que 4 kb por indivíduo (além de bandas menores que por opção não são consideradas nos cálculos) e sozinha permite uma probabilidade média de exclusão de 99,98% (28). A associação da F10 com duas outras sondas multilocais [DNF24 e (CA)_n] permite um

poder de exclusão superior a 99,999999%. As sondas multilocais são tão eficientes em determinação de paternidade que permitem distinguir com facilidade quem é o pai biológico em casos em que dois irmãos ou pai e filho são os indigitados possíveis pais.

A análise dos dados laboratoriais gerados por sondas multilocais de DNA em determinação de paternidade é simples e direta (Figura 2). Após os exames serem completados, são obtidas imagens em filmes de raios X (autorradiografias) constituídas de várias bandas, as quais conjuntamente formam as "impressões digitais de DNA" das pessoas testadas. Fotografias dessas imagens são incorporadas aos laudos periciais como evidência física do resultado do exame. Desse modo, a interpretação dos dados feita pelo perito pode ser ratificada por quem tem acesso ao laudo pericial.



Nos casos em que não há exclusões, a avaliação estatística e o cálculo do índice de paternidade baseiam-se em um único parâmetro: a proporção x de bandas que são em média compartilhadas por pessoas não aparentadas (23,29). É importante salientar que estudos realizados com sondas multilocais em grupos étnicos diferentes não mostraram nenhuma variação significativa no valor de x . Também a consangüinidade não afeta a eficácia das sondas multilocais. A frequência de compartilhamento de bandas x permanece a mesma quando calculada para pares marido-esposa (que, por definição, são representativos do padrão local de endogamia em uma comunidade). Assim, não há nenhuma evidência de que a existência de subgrupos de casamentos consangüíneos vá comprometer os resultados das perícias com sondas multilocais (23,30). Isto ocorre porque a frequência de compartilhamento de bandas (x) não é um parâmetro populacional apenas, sendo ditada em sua maior parte pelo nível de resolução eletroforética dos géis. Como resultado disso, muitos locos variáveis diferentes contribuem bandas para um dado intervalo de gel, oferecendo dessa maneira uma atenuação de mudanças nas frequências genotípicas que poderiam ser causadas por endocruzamento. Estas valiosas propriedades, aliadas a grande informatividade, estabilidade somática e herança mendeliana tornam as impressões digitais de DNA, obtidas especificamente com a metodologia das sondas multilocais, os testes mais poderosos disponíveis na atualidade para perícias médico-legais de paternidade (29,30).

Sondas unilocais

Como o próprio nome indica, cada sonda unilocal examina um minissatélite diferente de cada vez, ao contrário das sondas multilocais que reconhecem vários, simultaneamente. Existem muitas sondas unilocais disponíveis que podem ser combinadas para uso em determinação de paternidade (23). Que critérios devem ser usados para a escolha das sondas específicas? As sondas devem ser locoespecíficas, de preferência não devem estar no mesmo braço cromossômico e devem apresentar bom equilíbrio e estabilidade. Entre os locos usualmente usados, o mais variável e informativo é o D1S7 (MS1), com mais de 99% de heterozigose. Entretanto, sua elevada taxa de mutação (0,05 por gameta) o torna inadequado para testes de paternidade. Por outro lado, locos com variabilidade mais baixa (<96% de heterozigose) tendem a apresentar distribuições de frequências alélicas irregulares, de

maneira que pequenos erros na medida do tamanho dos alelos podem resultar em desvios relativamente grandes nas estimativas das frequências. Eles são também mais vulneráveis a efeitos de deriva genética e endogamia. Chakraborty e Jin (31) desenvolveram uma teoria estatística que permite estabelecer quantos locos devem ser tipados a um dado nível de heterozigose (H) para permitir inferências não-ambíguas sobre relações de parentesco. Por exemplo, se usarmos somente locos de minissatélites com $H \sim 90\%$ precisaremos estudar seis locos diferentes para distinguir sempre relações do tipo pai-filho.

Utilização do PCR para análise unilocal

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma alternativa às sondas unilocais, já que permite o estudo de apenas um loco polimórfico de cada vez. É possível amplificar minissatélites e microsatélites utilizando iniciadores elaborados a partir de seqüências de DNA flanqueando as repetições em tandem (23). O uso da metodologia de PCR no laboratório tem duas vantagens distintas: 1) a identificação dos alelos é simples, facilitando consideravelmente o cálculo dos índices de paternidade em comparação com as sondas unilocais; 2) a sensibilidade é elevada, permitindo que o exame seja feito com quantidades mínimas de DNA genômico, mesmo em avançado estado de degradação. Assim, a metodologia da PCR tornou possível testar a paternidade em situações anteriormente impossíveis, como, por exemplo, utilizando cabelos ou até mesmo material exumado (ossos, dentes) em perícias após a morte do possível pai. A principal desvantagem da PCR é que a técnica está limitada ao estudo de regiões genéticas pequenas, ou seja, microsatélites e minissatélites curtos (com poucas repetições), os quais são relativamente pouco informativos para testes de paternidade, já que têm baixa heterozigose, poucos alelos e distribuição irregular de frequências alélicas, potencialmente vulnerável à deriva genética e efeitos de subestruturação em grupos étnicos. De acordo com Chakraborty e Jin (31), o número de locos necessários para determinar com segurança relações pai-filho sobe para algo ao redor de 15 com $H \sim 70-80\%$ (valor usual de diversidade para microsatélites). Isto ocorre porque, na prática, as populações apresentam considerável grau de subestruturação e o poder de exclusão efetivo é consideravelmente inferior ao valor calculado teoricamente (32). É preocupante a observação de que alguns laboratórios de determinação de paternidade no Brasil estão oferecendo perícias a partir de resultados baseados em apenas 6-9 testes de PCR de microsatélites, incorrendo o risco de chegarem a conclusões equivocadas.

Paradoxo operacional

Sob o ponto de vista lógico, exclusões de paternidade são categóricas, enquanto inclusões são probabilísticas. Entretanto, é um fato pouco compreendido que a situação operacional dentro do laboratório é inversa. Erros técnicos nos procedimentos de testes de paternidade podem criar falsas exclusões, ao passo que é praticamente impossível criar uma falsa inclusão. Assim, todos os laboratórios devem obrigatoriamente possuir mecanismos que reconfirmem rotineiramente todas as exclusões, para efetivamente garantir que elas representam "verdadeiras exclusões". No Núcleo de Genética Médica (GENE), em Belo Horizonte, as rotinas descritas abaixo são seguidas rigorosamente em casos de exclusões, visando eliminar a possibilidade de trocas de amostras na coleta ou no laboratório:

1) realização de um teste de "maternidade" que estabelece se o compartilhamento de alelos entre a mãe e o filho é compatível com um parentesco de primeiro grau; 2) repetição da análise dos resultados com inversão dos dados entre mãe e filho; 3) coleta de duas amostras de sangue de cada pessoa. Rotineiramente, uma amostra de DNA é preparada a partir do primeiro tubo e testada com a metodologia de sondas multilocais. Se houver uma exclusão, a confirmação do resultado é feita com o segundo tubo de sangue (figura 2) Para fugir de armadilhas técnicas tais como digestão parcial e mutações de bandas, o GENE executa a confirmação da exclusão com testes auxiliares, usando a metodologia da PCR.

Conclusões

Em síntese, a eficácia e confiabilidade da determinação da paternidade pelas impressões digitais multilocais do DNA humano está amplamente fundamentada na literatura científica internacional com base em dados genéticos e populacionais. A técnica das impressões digitais de DNA com sondas multilocais combina características desejáveis de elevado nível de informação aliado a insensibilidade à flutuações de frequências alélicas entre diferentes populações ou dentro delas. Resultados empíricos de milhares de famílias testadas mostraram que os testes com sondas multilocais efetivamente resolvem todas as perícias de paternidade nas quais a criança, a mãe e o possível pai estão disponíveis para teste (29,30). Perícias em casos ditos "de deficiência" (em que a mãe ou o possível pai não estão disponíveis para o teste) podem ser igualmente resolvidas, mas por razões de espaço não serão aqui discutidas. Sondas unilocais, por outro lado, têm alto grau de informação, com o problema que a classificação de alelos é prejudicada pela distribuição quasicontínua do tamanho dos alelos. Desde que as taxas de mutação sejam conhecidas e que as frequências alélicas adequadas estejam estabelecidas nos principais grupos étnicos, baterias de exames compostas por 5-6 sondas unilocais com alto nível de informação devem ser também capazes de resolver todas as perícias-padrão de paternidade. Já a metodologia de tipagem de microsatélites e minissatélites curtos pela PCR tem a vantagem de apresentar distribuições alélicas discretas, apesar da classificação absoluta

dos alelos ainda não ser possível devido a variações internas das seqüências. Entretanto, como a variabilidade da maioria dos microssatélites e minissatélites curtos estudados pela PCR é limitada, um elevado número de locos (15 ou mais) precisa ser estudado de modo a fornecer níveis aceitáveis de poder de exclusão. Por outro lado, os microssatélites são muitos úteis como testes adicionais às sondas multilocais e unilocais, ou como testes de primeira linha quando as amostras a ser utilizadas são pequenas ou estão degradadas. De qualquer forma, os laboratórios de determinação de paternidade devem ter domínio técnico sobre todas as três categorias de testes disponíveis e usá-las racionalmente em cada caso. Dessa maneira, deverão poder resolver todas as disputas de paternidade sem nenhuma sombra de dúvida, ou seja, com 100% de confiabilidade nas exclusões e com mais de 99,9999% nas inclusões.

Como previmos já em 1991 (33), tem ocorrido no Brasil uma grande proliferação de laboratórios oferecendo exames de determinação de paternidade em DNA. Assim, os próprios consumidores, e nos casos judiciais os advogados e juízes, têm de fazer escolhas, muitas vezes entre serviços que realizam perícias médico-legais utilizando metodologias completamente diferentes em eficiência e complexidade metodológica. Esta heterogeneidade está freqüentemente disfarçada pela utilização publicitária da expressão "teste de DNA". Como vimos acima, na determinação de paternidade pelo DNA podem ser utilizados diferentes "testes em DNA", ou seja, testes com sondas multilocais (impressões digitais de DNA), testes com sondas unilocais e testes com a PCR. O GENE utiliza todos os três métodos em combinações variadas de acordo com o caso específico, visando sempre obter o máximo possível de confiabilidade para o resultado. Entretanto, outros laboratórios podem optar por utilizar apenas uma única metodologia, diminuindo assim a necessidade de desenvolvimento de uma metodologia de maior complexidade - como as impressões digitais de DNA pelas sondas multilocais - e minimizando os custos laboratoriais. Quais são, então, os parâmetros pelos quais podemos comparar a qualidade de laboratórios diferentes que utilizem métodos diversos? Abaixo, listamos alguns elementos que consideramos cruciais e que podem ser empregados para avaliar a confiabilidade de um serviço de determinação de paternidade pelo DNA:

1. O laboratório deve estar sob a direção de um médico, de preferência com um título de mestre ou doutor (Ph.D.) em genética, biologia molecular ou bioquímica e com comprovada competência prática e teórica em determinação de paternidade;
2. O laboratório deve realizar as perícias com duas sondas multilocais, ou então 6 sondas unilocais ou pelo menos 12 microssatélites estudados pela PCR. O laboratório deve, ainda, dominar tecnicamente pelo menos duas das três metodologias existentes para testes de determinação de paternidade em DNA;
3. O laboratório deve possuir uma rotina de trabalho que impossibilite que erros - tais como troca de rótulos em tubos - passem despercebidos;
4. No caso de sondas unilocais ou estudo de microssatélites pela PCR, o laboratório deve ter construído um banco de dados das freqüências populacionais dos sistemas genéticos por ele empregados. Este banco de dados deve ter sido obtido com as mesmas técnicas usadas pelo laboratório na determinação de paternidade, e utilizando a mesma população. Bancos de dados da população americana ou européia não são aplicáveis no Brasil. O banco de dados deve estar disponível para consulta e, preferencialmente, ter sido publicado;
5. Nos casos em que há exclusão da paternidade, o laboratório deve garantir que esta exclusão seja comprovável com pelo menos dois tipos de exames genéticos diferentes;
6. Nos casos em que não há exclusão da paternidade, o laudo pericial deve incluir o Índice de Paternidade para cada sistema genético utilizado, o Índice de Paternidade Final e a Probabilidade de Paternidade sendo explicitadas as probabilidades a priori utilizadas.

A ética médica na determinação de paternidade

Defendemos a posição que a perícia de determinação de paternidade é inalienavelmente um *ato médico*, alicerçado em *capacitação técnica*, como exposto acima, mas igualmente em uma capacitação ética. A atuação desavisada de profissionais inadequadamente formados nos aspectos éticos e médico-legais pode levar a resultados desastrosos. A prática da determinação de paternidade deve espelhar a medicina como um todo e pautar rigidamente o seu trabalho de acordo com cinco princípios éticos fundamentais: *autonomia, privacidade, justiça, igualdade e qualidade*.

De acordo com o princípio da autonomia, os testes de paternidade deverão ser estritamente voluntários e a informação resultante deles deve ser absolutamente pessoal. Seguindo o princípio da privacidade, os resultados dos testes genéticos de determinação de paternidade de um indivíduo não poderão ser comunicados a nenhuma outra pessoa sem seu consentimento expresso. O princípio da justiça garante que o perito se manterá absolutamente imparcial na avaliação científica dos resultados dos exames de paternidade por ele realizados, independente da identidade das pessoas envolvidas. O princípio da igualdade rege que todas as perícias serão tratadas com igual seriedade, sem qualquer consideração de classe sócioeconômica, origem geográfica, raça e

religião. Finalmente, o princípio da qualidade deve assegurar que todos os exames de paternidade serão feitos com a tecnologia mais moderna disponível e que os laudos de paternidade oferecidos terão confiabilidade absoluta.

Abstract- *DNA as the (only) Witness in Determining Paternity*

The need to establish paternity relationships often arises legally, socially or medically. Since conception occurs inside the woman's body and thus cannot have witnesses, the only effective way to solve this problem is through genetic testing. In special, DNA tests allow us to resolve paternity disputes with certainty in virtually every case. This can be achieved with multilocus minisatellite probes, batteries of single locus probes or PCR testing of sets of minisatellite and microsatellite loci. Differences in the efficiency of these several techniques can be compensated for by adjusting the number of tests performed. In this article we review the advantages and drawbacks of each of the three methodologies most commonly used to resolve paternity cases. On these bases, we propose criteria to judge the reliability of laboratories involved in paternity testing. Finally we stress the fact that paternity testing is a medical act, based not only on technical competence but also on ethical qualification. Ill advised participation in paternity testing by professionals inadequately trained in ethics and medical forensics can produce disastrous results.

Referências Bibliográficas

1. Buss DM. Psychological sex differences: origins through sexual selection. *Am Psychol* 1995;50:164-8.
2. Betzig L. Causes of conjugal dissolution: a cross-cultural study. *Curr Anthropol* 1989;30:654-76.
3. Buss DM. Paternity uncertainty the complex repertoire of human mating strategies. *Am Psychol* 1996;51:161-2.
4. Macintyre S, Sooman A. Non-paternity prenatal genetic screening. *Lancet* 1991;338:869-71.
5. Baker R, Bellis M. Human sperm competition. New York: Chapman Hall, 1995.
6. Brock DJH, Shrimpton AE. Non-paternity prenatal genetic screening. *Lancet* 1991;338:1151.
7. LeRoux MG, Pascal MT, Herbert O, David A, Moisan JP. Non-paternity and genetic counselling. *Lancet* 1992;340:607.
8. Sasse G, Müller H, Chakraborty R, Ott J. Estimating the frequency of nonpaternity in Switzerland. *Hum Hered* 1994;44:337-43.
9. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation: effects on the probability of conception survival of the pregnancy sex of the baby. *New Engl J Med* 1995;333:1517-21.
10. James WH. The incidence of superfecundation of double paternity in the general population. *Acta Genet Med Gemellol* 1993;42:257-62.
11. Lu H L, Wang CX, Wu FQ, Li JJ. Paternity identification in twins with different fathers. *J Forens Sci* 1994;39:1100-2.
12. Verma RS, Luke S, Dhawan P. Twins with different fathers. *Lancet* 1992;339:634.
13. Wenk RE, Houtz T, Brooks M, Chiafari FA. How frequent is heteropaternal superfecundation? *Acta Genet Med Gemellol* 1992;41:43-7.
14. Alem JA. Investigação de paternidade: doutrina e jurisprudência. São Paulo: EU, 1987.
15. Negrão T. Código de Processo Civil e legislação processual em vigor. 27a. ed. São Paulo: Saraiva, 1996.
16. Sheridan R, Llerena J, Matkins S, Debenham P, Cawood A, Bobrow M. Fertility in a male with trisomy 21. *J Med Genet* 1989;26:294-8.
17. Sokol RZ, Sparkes R. Demonstrated paternity in spite of severe idiopathic oligospermia. *Fertil Steril* 1987;47:356-8.
18. Terzoli G, Lalatta F, Lobbiani A, Simoni G, Colucci G. Fertility in a 47XXY patient: assessment of biological paternity by deoxyribonucleic acid fingerprinting. *Fertil Steril* 1992;58:821-2.
19. Pena SDJ, Prado VF; Epplen JT. DNA diagnosis of human genetic individuality. *J Mol Med* 1995;73:555-64.
20. Pena SDJ, Macedo AM, Braga VMM, Rumjanek FD, Simpson AJG. F10 the gene for the glycine-rich major eggshell protein of *Schistosoma mansoni* recognizes a family of hypervariable minisatellites in the human genome. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7466
21. Ip NY, Nicholas L, Baum H, Balazs I. Discovery of a novel multilocus DNA polymorphism [DNF24]. *Nucleic Acids Res* 1989;17:4427
22. To affinity ... beyond! [editorial]. *Nat Genet* 1996;14:367-70.
23. Pena SDJ, Jeffreys AJ. Breve introdução às impressões digitais de DNA. *Rev Bras Genet* 1993; 16:857-79.
24. Popper K. The logic of scientific discovery. 3rd ed. London: Hutchinson, 1972.
25. Li CC, Chakravarti A. An expository review of two methods of calculating the paternity probability. *Am J Hum Genet* 1988;43:197-205.

26. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 1985;314:67-73.
27. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 1985;316:76-9.
28. Pena SDJ, Santos PC, Campos MCBN, Macedo AM. Paternity testing in Brazil by DNA fingerprinting with the multilocus probe F10. *Cienc Cult* 1993;45:236-40.
29. Pena SDJ, Chakraborty, R. Paternity testing in the DNA era. *Trends Genet* 1994;10:204-9.
30. Jeffreys AJ, Turner M, Debenham P. The efficiency of multilocus DNA fingerprinting probes for individualization and establishment of family relationships, determined from extensive casework. *Am J Hum Genet* 1991;48:824-40.
31. Chakraborty R, Jin L. A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ, editors. *DNA fingerprinting-state of the science*. Basel: Birkhauser, 1993: 153-76.
32. Pena SDJ. Pitfalls of paternity testing based solely on PCR typing of minisatellites and microsatellites. *Am J Hum Genet* 1995;56:1503-4.
33. Pena SDJ. Determinação de paternidade pelo estudo direto do DNA: estado da arte no Brasil. In: Teixeira SF, editor. *Direitos de família e do menor: inovações e tendências*. Belo Horizonte: Del Rey, 1991: 65-81.

Endereço para correspondência:

Núcleo de Genética Médica de Minas Gerais (GENE)

Av. Afonso Pena, 3.111/9

30130-909 Belo Horizonte-MG

e-mail: spena@dcc.ufmg.br