

USO DAS TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NA GENÉTICA FORENSE

Viviane da Silva Leite ¹

Mara Ilka Holanda de Medeiros Batista ²

Evelyne Pessoa Soriano ³

Marcus Vitor Diniz de Carvalho ⁴

Ana Paula Veras Sobral ⁵

Fecha de publicación: 01/10/2013

RESUMO:

Os avanços nas tecnologias de DNA surtiram um enorme impacto no campo da ciência forense. Com uma incrível sensibilidade e um alto poder de discriminação, a análise de DNA tem sido uma poderosa ferramenta para a identificação humana e investigações criminais. O presente estudo fará uma revisão sobre as técnicas de Biologia Molecular mais significativas – RFLP, VNTR, PCR e STR – que foram desenvolvidas nas últimas décadas, tendo como princípio o estudo de diferentes polimorfismos de DNA para a identificação precisa de indivíduos. Por um longo tempo, estes polimorfismos foram detectados por técnicas que possuíam como base a eletroforese. Outra técnica que também será exposta, Southern Blotting, visa a identificação de uma sequência de bases

-
- ¹ Biomédica, aluna do Mestrado em Perícias Forenses na Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco (FOP-UPE), Camaragibe, PE.
- ² Cirurgiã-Dentista, aluna do Mestrado em Perícias Forenses na Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco (FOP-UPE), Camaragibe, PE. E-mail: marailka@hotmail.com
- ³ Professora do Mestrado em Perícias Forenses na Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco (FOP-UPE), Camaragibe, PE (BRASIL).
- ⁴ Professor do Mestrado em Perícias Forenses na Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco (FOP-UPE), Camaragibe, PE (BRASIL).
- ⁵ Professora do Mestrado em Perícias Forenses na Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco (FOP-UPE), Camaragibe, PE (BRASIL).

específicas do DNA, que foi por muito tempo aplicada tanto na detecção de SNPs como de VNTRs e STRs. Além disso, será descrita a reação em cadeia da polimerase (PCR), um método laboratorial capaz de copiar milhões de vezes um segmento do DNA, que se destaca perante outras técnicas por ser um procedimento relativamente simples e fácil de realizar em laboratório, gerando resultados precisos e satisfatórios, em um curto espaço de tempo. Por fim, serão descritos os métodos automatizados que, a partir de PCR, permitem a detecção rápida de marcadores moleculares, a fim de facilitar e tornar mais precisa a identificação forense.

PALAVRAS-CHAVE - Técnicas de biologia molecular, Genética forense, Perfil de DNA, Investigações criminais.

USE OF MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES IN FORENSIC GENETIC

ABSTRACT

The advent of DNA-based technologies promoted significant impact in the field of forensic science. According to its high sensibility and powerful discrimination, the DNA analyses have been a powerful tool to human identification and criminal investigations. The present study will be taken to produce a review about the most important techniques of molecular biology developed in recent decades, such as RFLP, VNTR, PCR and STR. These techniques are based in the study of different polymorphisms in the DNA and it could be used in the precise subjects identification. For a period, these polymorphisms were detected through techniques based in electrophoresis. Besides, other procedures will be explained, like Southern Blotting that aims to identify specific DNA sequences and could be applied in the research of SNPs, VNTRs and STRs. It will be also described the Polimerase Chain Reaction (PCR), a laboratorial method able to amplify millions of a short DNA segment. This technique has some advantages through the others because it is a simple and easy procedure to be done in laboratories, and could offer accurate and satisfactory results in a short period of time. Concluding, automated techniques based in PCR will be present that permit fast detection of molecular evidences in order to facilitate and promote reliable forensic identification.

KEYWORDS - Molecular Biology Techniques, Forensic Genetic. DNA profiling, Criminal investigation.

INTRODUÇÃO

Em meados dos anos 80, o primeiro método de utilização de análise de DNA para identificar indivíduos foi desenvolvido, por Alec Jeffreys, da Universidade de Leicester e, no início, havia muitas dúvidas quanto à reprodutibilidade e a confiabilidade dos métodos¹. Após o avanço da ciência e tecnologia, a análise do DNA a nível forense, tornou-se uma das mais poderosas ferramentas para a identificação humana e investigações criminais².

As primeiras técnicas forenses de identificação humana eram convenientes apenas para análise de DNA de evidências biológicas que contivessem células nucleadas. Atualmente, com a implementação do sequenciamento do DNA mitocondrial, essa limitação tem sido superada. Se antes, impressões digitais e outras pistas eram usadas para desvendar crimes; hoje, são inúmeros os espécimes biológicos dos quais o DNA pode ser extraído. Podemos encontrá-lo em pequenas amostras de sangue, ossos, sêmen, cabelo, dentes, unhas, saliva, urina, entre outros fluidos, e análises cuidadosas desse material ajudam a identificar criminosos².

As aplicações da Biologia Molecular no laboratório criminal centralizam-se, em grande parte, na capacidade da análise do DNA em identificar um indivíduo a partir de cabelos, manchas de sangue e fluidos corporais, entre outros itens recuperados no local do crime. Essas técnicas são conhecidas como datiloscopia genética (*genetic fingerprinting*), embora o termo mais preciso e utilizado para designá-las seja perfil de DNA³.

Segundo Pena (2005)⁴, a determinação de identidade genética pelo DNA pode ser usada para demonstrar a culpabilidade dos criminosos, exonerar os inocentes, identificar corpos e restos humanos em desastres aéreos e campos de batalha, determinar paternidade com confiabilidade praticamente absoluta, elucidar trocas de bebês em berçários e detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica.

Sendo assim, entende-se que, existem quatro grandes vantagens que devem ser citadas sobre a tipagem molecular do DNA: a primeira e de maior importância é, sem sombra de dúvida, a possibilidade de sua extração de qualquer fonte de material biológico, a segunda é que o DNA possui um alto potencial discriminatório, a terceira é a alta estabilidade química mesmo após um longo período de tempo, estando presente em todas as células nucleadas do organismo humano, e a quarta vantagem do DNA, reside na possibilidade de separá-lo da célula espermática, de qualquer outro DNA celular⁵.

Atualmente a identificação humana forense por análise do DNA já é aceita em processos judiciais em todo o mundo, sendo possível inclusive à

identificação de pessoas mortas, há centenas de anos, utilizando DNA obtido de ossos ou dentes⁶.

O número de tribunais que têm aceitado evidências baseadas no DNA cresce a cada dia, levando-nos a crer que, em um futuro muito próximo, esta tecnologia será empregada em todo o Sistema Legal. Porém para que não ocorra nenhum tipo de erro e para a precisão dos resultados, regras rígidas de coleta e processamento das amostras devem ser adotadas⁷.

Assim disposto, entende-se que a genotipagem forense se presta, no núcleo principal de sua finalidade, a estabelecer os correspondentes vínculos genéticos entre amostras-questionadas, vestígios de origem biológica desconhecida, e amostras-referência, de origem biológica conhecida, concluindo-se pela determinação da origem individual de cada vestígio e, a partir desse ponto e mesmo coligado a outros meios de prova, eventualmente reconstruir parcial ou totalmente a dinâmica do ato criminoso.

REVISÃO DA LITERATURA

Informação Genética

As informações genéticas individuais estão armazenadas sob a forma de ácidos nucleicos. Os ácidos nucleicos foram descobertos em 1869 por Friedrich Miescher e no início do século XX o bioquímico Kossel evidenciou a existência de dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucléico (DNA) e o ácido ribonucléico (RNA). O DNA contém o gene enquanto que o RNA serve como agente intermediário na atividade do gene. O RNA mensageiro (mRNA) é transcrito a partir do DNA e traduzido em seqüências de aminoácidos que formam as proteínas⁸.

O DNA é uma molécula extremamente longa, formada por duas cadeias de polinucleotídeos enrolados de forma helicoidal e ligados transversalmente através de pontes de hidrogênio. Cada nucleotídeo é constituído por três unidades básicas: uma base nitrogenada, uma molécula de açúcar (desoxirribose) e um grupamento fosfato (PO₄). A adenina e a guanina contêm dois anéis carbônicos, sendo chamadas de purinas; a citosina e a timina são conhecidas como pirimidinas. A adenina forma pontes com a timina (ligações de duas pontes de hidrogênio); e a guanina com a citosina (ligações de três pontes de hidrogênio). Para cada nucleotídeo de adenina existe um de timina (A-T), e para cada nucleotídeo de guanina existe um de citosina (G-C), formando duas cadeias que são designadas por complementares⁸, citado na Figura 1.

O DNA pode ser encontrado nos cromossomos do núcleo (DNA genômico) e nas mitocôndrias (DNA mitocondrial). O DNA genômico é encontrado no núcleo de cada célula do corpo humano e representa uma

fonte de DNA para a maioria das aplicações forenses. Sua molécula é linear, conforme citado na Figura 2. Neste DNA estão localizados os genes, depositários das informações genéticas responsáveis pelas atividades da célula. Por outro lado, o interesse nos estudos forenses pelo DNA mitocondrial se deve principalmente ao fato deste apresentar resistência à digestão enzimática devido a sua estrutura circular, conforme citados na Figura 3, e sendo desta forma a análise desse tipo de DNA excepcional no estudo de tecidos antigos e até arqueológicos, como ossos, dentes e cabelos⁹.

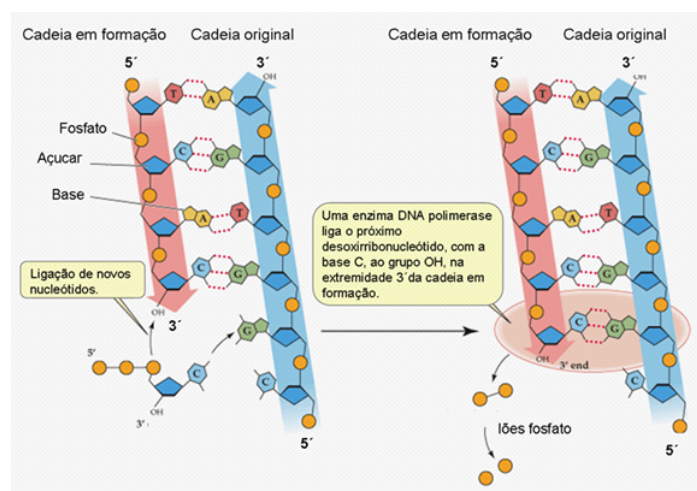


Figura 1: Representação esquemática da Molécula de DNA

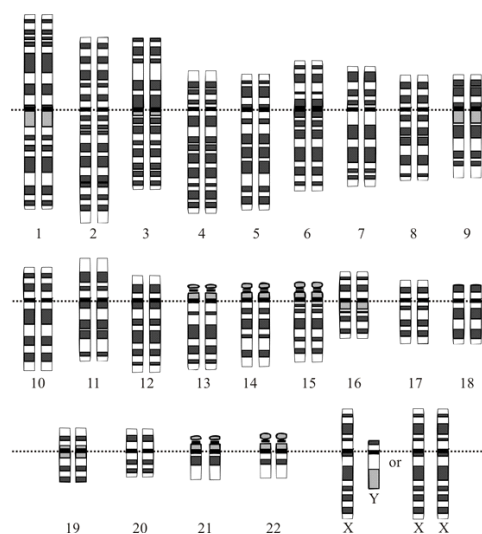


Figura 2: Representação esquemática do DNA genômico humano.

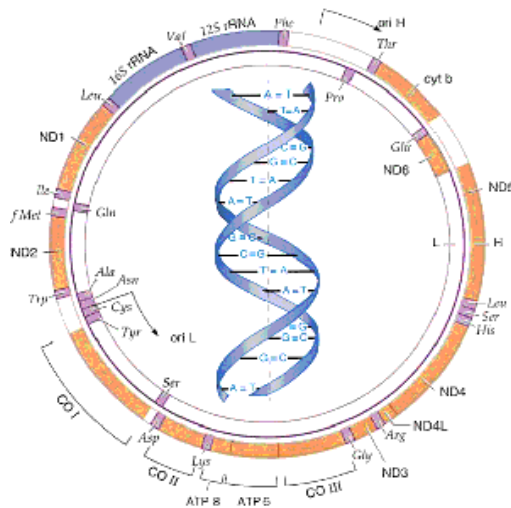


Figura 3: Representação esquemática do DNA mitocondrial (mtDNA) e suas regiões hipervariáveis

Aspectos Gerais da Análise do DNA Forense

O exame de DNA foi apontado como a maior revolução científica na esfera forense, desde o uso e reconhecimento das impressões digitais como uma característica pessoal, onde as técnicas de identificação fundamentadas na análise direta do ácido desoxirribonucléico ostentam pelo menos duas vantagens sobre os métodos convencionais de identificação: a estabilidade química do DNA, mesmo após longo período de tempo, e a sua ocorrência em todas as células nucleadas do organismo humano, o que permite condenar ou absolver um suspeito com vestígios encontrados na cena de um crime.

Em estudo realizado por Luftig (2001)¹⁰, este mencionou, que em agosto de 1986, na Inglaterra, um caso criminal envolvendo o estupro e homicídio de duas adolescentes foi solucionado com a determinação da autoria do delito após toda a população masculina de dois vilarejos do condado de Leicester ter contribuído com a doação de amostras de sangue para confronto com vestígios de sêmen coletados do corpo das vítimas. Estava assim inaugurada uma nova página no emprego da biologia molecular e sua utilização na identificação humana criminal.

Desde 1989, a Sociedade Internacional de Genética Forense, vem demonstrando interesse em avaliar a reprodutibilidade e exatidão das metodologias utilizadas. O FBI (*Federal Bureau of Investigation*) acrescenta alguns itens para o controle de qualidade dos laboratórios que trabalham com evidências de DNA forense, que inclui, além desses cuidados, a realização de periódicos testes de proficiência (a cada 180 dias) e auditorias anuais, para a manutenção da garantia de qualidade. O teste de proficiência é utilizado para monitorar o rendimento e identificar tópicos

que devem ser aperfeiçoados e a auditoria para averiguar a qualidade das atividades realizadas pelo laboratório¹¹.

Segundo Jobim (2006)¹², o estudo do DNA possibilitou obter informações sobre a individualidade humana, iluminando a ciência da investigação e da identificação em casos criminais. Uma mudança total na tecnologia aconteceu a seguir, pois o estudo do polimorfismo do DNA substituiu, em curto espaço de tempo, as análises sorológicas dos polimorfismos de proteínas e grupos sanguíneos, até então, usados exclusivamente na área forense. Para o autor as técnicas de amplificação do DNA pela PCR na última década tiveram um enorme progresso. Foram também desenvolvidos novos métodos de extração do DNA do sangue periférico, tecidos, ossos, cabelos, manchas de sangue, material vaginal, entre outros.

O sucesso da tipagem de DNA depende basicamente da qualidade e quantidade de DNA extraído das diversas fontes. Nos exames de paternidade, o DNA é geralmente extraído de amostras coletadas em condições ideais. Já na determinação de identidade, o material obtido nem sempre está em boas condições. Às vezes há pouco DNA, ou este está contaminado ou degradado. Nesses casos a extração de DNA adequado para a análise talvez seja a etapa mais importante do processo. São também analisados polimorfismos presentes no DNA mitocondrial e no cromossomo Y¹³.

Além dos cuidados que devem ser tomados com todas as evidências criminais e civis, nos casos que envolvem análises de DNA, deve-se ter atenção em relação à contaminação das evidências criminais que contenham material genético. Por isso é importante o uso de luvas descartáveis, máscaras e gorros cirúrgicos quando for fazer a coleta, manuseio e processamento das evidências¹³.

Os exercícios propostos para laboratórios que realizam caracterização de vínculo genético normalmente são constituídos de amostras biológicas de mãe, filho e suposto pai, com o intuito de comparar as estratégias utilizadas, seus protocolos metodológicos, assim como os resultados obtidos entre os participantes¹⁴.

Tendo em vista assegurar uma geração de dados corretos e tecnologias adequadas, um apropriado programa de controle de qualidade é essencial para todos os laboratórios de análises clínicas que realizam identificação humana pelo DNA¹⁵.

Fundamentos da Biologia Molecular

A Biologia Molecular é o estudo da Biologia a nível molecular, com especial foco no estudo da estrutura e função do material genético e seus produtos de expressão, as proteínas. Mais concretamente, a Biologia Molecular investiga as interações entre os diversos sistemas celulares, incluindo a relação entre DNA, RNA e síntese proteica. É um campo de estudo alargado, que abrange outras áreas da Biologia e da Química, em especial Genética e Bioquímica. Nas últimas décadas, muitas técnicas foram desenvolvidas, objetivando a identificação genética precisa de indivíduos¹⁶.

Na Biologia Molecular é frequentemente combinada técnicas e ideias provindas da Microbiologia, Genética, Bioquímica e Biofísica. Historicamente, a Microbiologia exerceu um papel fundamental no desenvolvimento da Biologia Molecular, pois a maioria dos conceitos-chave e das técnicas de Biologia Molecular se originou a partir de estudos e experimentos realizados principalmente com bactérias, fungos e vírus¹⁷.

Muito da investigação em Biologia Molecular é relativamente recente, e muitos trabalhos têm sido feitos recorrendo-se à Bioinformática e Biologia Computacional. Estes recursos tornaram o estudo da estrutura e função de genes, ou Genética Molecular, num dos campos mais proeminentes em Biologia Molecular¹⁷.

Nos EUA o FBI implantou o CODIS – *Combined DNA Index System*, que se tornou operacional em 1998, e combina a biologia molecular com a tecnologia eletrônica, formando um banco de dados de perfis genéticos de DNA extraído de evidências biológicas coletadas na cena do crime e DNA de criminosos condenados por vários tipos de violência física, possibilitando averiguar se o mesmo cometeu anteriormente outra infração¹¹.

Um dos maiores progressos da ciência está relacionado a análise do DNA, onde a biologia molecular tem se tornado uma ferramenta indispensável na investigação criminal, desde a descoberta das impressões digitais. Métodos para determinar o perfil do DNA estão firmemente embasados na tecnologia molecular. Quando a determinação do perfil é feita com cuidados adequados, os resultados são altamente reprodutíveis¹.

Metodologia Aplicada à Identificação Humana:

A análise do DNA em caracterização de vínculo genético engloba desde o domínio da metodologia de coleta do material biológico até a interpretação dos resultados obtidos¹⁸.

Cada metodologia possui sua particularidade e cuidados inerentes à técnica que podem favorecer vantagens e desvantagens, de acordo com o

objetivo almejado. A análise do DNA compreende diversas etapas, independente da metodologia a ser empregada e do tipo de amostra que será analisada¹⁹.

O processo envolvendo a biologia molecular na forense inclui: 1) coleta de amostras; 2) extração, purificação e quantificação do DNA de todas as amostras; 3) análise dos *loci*; 4) visualização dos fragmentos e caracterização (com o uso da Eletroforese); 5) interpretação e análise comparativa dos resultados²⁰.

Coleta de Amostras para Análise Forense

A coleta de amostras para o exame de DNA deve ser realizada logo após a identificação possível pelos médicos-legistas, odonto-legistas e papiloscopistas, mesmo quando esta identificação for positiva, pois pode ser necessário um futuro confronto genético para elucidação de dúvidas com relação à identidade do indivíduo e troca de corpos²¹.

A escolha do tipo de amostra a ser coletada depende da conservação da amostra, onde os dentes e ossos são os materiais que se preservam por mais tempo, mesmo quando submetidos a diferentes fatores de degradação.

A coleta e os métodos de preservação das provas coletadas na cena do crime têm um grande impacto no tribunal. Do ponto de vista técnico e criminalista, o DNA pode ser coletado da maioria dos espécimes biológicos, pois é uma molécula estável em ambiente seco e frio.

Se armazenado em tais condições, tem grandes chances de resultados confiáveis. Em geral, uma quantidade significativa de material deve ser coletada para garantir a extração de DNA suficiente para os testes². No entanto, é importante preservar a coleta de sujeira adicional, gorduras, fluidos e outros materiais que possam afetar o processo de tipagem de DNA²².

O material biológico recuperado na cena do crime pode sofrer alterações ambientais (luz, altas temperaturas, reativos químicos, etc.) que poderão ocasionar quebras e alterações da cadeia de nucleotídeos e, como consequência, modificar a composição e a estrutura normal do DNA, impossibilitando a análise²³.

O armazenamento do material biológico úmido em sacos plásticos deve ser de no máximo 2 horas ou, quando possível, permitir que seque antes do acondicionamento final. Cada tipo de amostra de material biológico (sangue, saliva, osso, dente, etc.) deve ter sua coleta e disposição individualmente descrita. A degradação do DNA de amostras biológicas, utilizadas em investigação criminal, pode ocorrer decorrente de um processo natural de exposição ao meio-ambiente. Luz, umidade,

temperaturas elevadas, bem como contaminação bacteriana ou fúngicas levam à degradação química do DNA humano²⁴.

Extração de DNA Forense

O DNA pode ser extraído de amostras de sangue, de esfregaços bucais, de saliva, de osso, de dente, de tecidos e órgãos, de fios de cabelos, de sêmen, entre outros materiais biológicos¹⁶.

A quantidade, a pureza e a integridade do DNA dependem de vários fatores, podendo ser influenciados pelas metodologias aplicadas para sua extração. Após a coleta do material biológico, o DNA da amostra deverá ser separado de outras substâncias celulares antes de ser examinado. Proteínas celulares, contaminações químicas e microbiológicas diminuem o poder discriminatório das análises utilizando o DNA¹⁸.

A escolha do uso de diferentes métodos de extração de DNA está relacionada ao tipo de material envolvido e influencia diretamente o sucesso da análise dos STRs. A maioria dos procedimentos de extração de DNA compreende a lise celular, seguida da remoção das proteínas celulares precipitadas e por fim a precipitação do DNA com sua final eleição.

A extração orgânica, que é o método mais tradicional na genética forense, o qual consiste na remoção dos resíduos de proteínas do DNA através da combinação de dois solventes orgânicos diferentes: Fenol e Clorofórmio. Esse método como qualquer outro, possui suas indicações, vantagens e desvantagens. Entre as principais vantagens temos: o baixo custo e um alto grau de pureza do DNA a ser investigado. As desvantagens são: demora em sua execução e é um método altamente tóxico²³.

A técnica mais amplamente empregada envolve, em sua primeira fase, a lise celular, seguida de desnaturação ou inativação de proteínas, com a utilização de proteinase K. Com solventes orgânicos o DNA é posteriormente separado de macromoléculas, como as proteínas através de solubilização em água, e em seguida precipitado com etanol. Outras metodologias com o mesmo princípio, inclusive kits comerciais, podem ser utilizadas para cada tipo de amostra biológica²⁴.

A quantidade, a pureza e a integridade do DNA dependem de vários fatores como condições da amostra e da conservação, sendo necessário utilizar critérios para escolha de metodologia de extração para cada tipo de amostra²⁵.

A resina magnética é outro método de extração de DNA muito utilizado na genética forense, sendo as mais utilizadas a DNA IQTM, da Promega e a ChargeSwitcha®, da Invitrogen. Em ambos os casos, Uma resina paramagnética é usada para capturar uma quantidade consistente de

DNA. A resina tem uma capacidade definida de ligação ao DNA, portanto, mesmo em presença excessiva de DNA, a resina só se ligará a uma quantidade definida de DNA. Uma vez que a recuperação depende do método de amostragem, apoio sólido e tipo de amostra, os laboratórios terão de determinar o rendimento médio para um tipo de amostra única. Uma vez que esse rendimento foi determinado, o pesquisador pode ignorar o passo de quantificação normalmente necessário, com outros processos de purificação²⁶.

Extração diferencial do DNA para crimes sexuais

A extração diferencial, muito empregada em amostras provenientes de crimes sexuais, é uma variação da extração orgânica e se baseia no fato de que os espermatozoides são células bem mais resistentes que as células epiteliais da mucosa vaginal. Esta técnica divide a etapa de lise celular em duas: a primeira mais branda, onde ocorre a quebra das membranas celulares das células epiteliais femininas, obtendo-se a fração não espermática (FNE), e a segunda, mais robusta, onde ocorre a lise das células espermáticas, obtendo-se a fração espermática (FE).

Quantificação de DNA

A quantificação do DNA após a sua extração é importante para o aperfeiçoamento da qualidade do produto de DNA resultante da PCR²⁷. O excesso de DNA em uma amostra de PCR poderá saturar a reação, fazendo com que apareçam artefatos de técnica e ampliações inespecíficas que podem dificultar a sua análise. Já a sua falta poderá acarretar a perda de um dos alelos, quando o indivíduo é heterozigoto, ou mesmo na sua não amplificação¹⁸.

A qualidade e quantidade de DNA devem ser examinadas após a extração, além de verificar a possibilidade de degradação. Quando se refere às amostras utilizadas em investigação criminal ou passíveis de degradação e contaminação, recomenda-se a utilização da quantificação de DNA humano. Essa quantificação pode ser realizada por hibridização de uma sonda utilizando um determinado *locus* em uma amostra de DNA imobilizada de uma membrana de náilon – dot blot e por kits comerciais como, por exemplo, o AluQuantTM *human DNA quantitation system*²⁷.

Apesar dessas técnicas serem mais complexas e caras que a espectrofotometria, elas quantificam somente o DNA humano, pois possuem sondas específicas para o mesmo. Tal característica pode ser imprescindível em casos forenses que haja a possibilidade de contaminação de DNA externo. No entanto, muitas vezes não é utilizada, pois há a necessidade de 5 a 10µL de produto de DNA, o que muitas vezes não é obtido²⁸.

Uma metodologia que está substituindo as outras técnicas de quantificação por utilizar pouca quantidade de DNA, ser específico para DNA e inclusive possibilitando verificar a presença de inibidores da enzima polimerase é a quantificação de DNA por PCR em tempo real. Principalmente em casos forenses que existe ínfima quantidade de DNA, está sendo altamente recomendada. Consiste no emprego de marcadores com fluorescência que são utilizados para a amplificação de regiões do genoma humano²⁹.

A PCR em tempo real é uma técnica que deve ser relatada, pelo fato de estar sendo aproveitada em ciências forenses para determinar a quantidade de DNA humano viável para amplificação. A PCR em tempo real amplia regiões específicas de DNA, conforme citado na figura 6. Essa técnica diferencia-se da PCR tradicional, por possuir sondas marcadas com fluoróforos propiciando detecção em tempo real dos fragmentos amplificados, sendo simultaneamente quantificados. Dessa maneira, não há necessidade de utilização de géis e análise por *Southern blotting*³⁰.

Entretanto, para realização da PCR em tempo real é necessário equipamento específico e sondas adequadas. O DNA humano pode ser especificamente quantificado para posterior análise do perfil genético pelas STRs, assim como verificar a presença ou não de inibidores da enzima polimerase³⁰.

Reação de Amplificação pela Polimerase – PCR

Uma tecnologia que revolucionou o campo da biologia molecular foi a PCR, tendo como seu inventor Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel em 1993, por essa descoberta. A PCR consiste na amplificação seletiva de uma sequência-alvo de DNA específica a partir de uma coleção heterogênea de DNA, empregando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores que são complementares a uma certa extensão em ambas as fitas do DNA a ser amplificado. A sequência-alvo de DNA, cuja continuação é originalmente conhecida, é denominada DNA molde³¹.

A enzima termoestável denominada DNA polimerase direciona o posicionamento dos precursores do DNA – dNTP – iniciando a síntese de novas fitas de DNA. Com um novo aumento de temperatura, a enzima DNA polimerase catalisa a reação, incorporando o nucleotídeo na posição terminal ao iniciador, complementando as bases do DNA molde, promovendo a extensão da fita³².

A reação de PCR é preparada utilizando-se diversos reagentes que devem possuir concentrações específicas para todo tipo de análise. Atualmente, existem diversos kits de PCR contendo todos os reagentes pré-padronizados que facilitam a utilização da PCR em laboratórios forenses. O

reagente que vai direcionar a otimização de cada reação será o *primer* ou iniciador, que flanqueará a região do DNA a ser copiada, sendo um oligonucleotídeo sintetizado quimicamente e é adicionado à reação em altas concentrações¹⁸.

Segundo BUTLER (2005)¹⁸, a PCR envolve três etapas: desnaturação, hibridização e polimerização. A desnaturação ocorre quando a molécula de DNA é aquecida acima da temperatura de 90°C, na qual as pontes de hidrogênio da dupla hélice se rompem, ocorrendo a separação das cadeias complementares. O passo seguinte é um o a hibridização dos *primers*, ligados a duas regiões: direto e reverso, a uma temperatura que pode variar de 45 a 72°C e deve ser previamente otimizada. O último passo é a polimerização onde a enzima DNA Polimerase catalisa a extensão da fita na direção 5' → 3', começando exatamente no *primer* incorporando o nucleotídeo apropriado (A – T , C – G).

Marcadores Moleculares

O *Single Sequence Length Polymorphism* (SSLP) ou polimorfismo de comprimento de sequência única englobam os VNTR ou repetições consecutivas de número variável³³, ou minissatélites, e também os STR ou repetições consecutivas curtas ou microssatélites, esses marcadores funcionam como impressão digital, no genoma de cada indivíduo³⁴.

A diferença entre eles é o tamanho da sequência que se repete, sendo que nos microssatélites essa estrutura é menor, pois possuem repetições constituídas de 2 a 9 pares de bases, e o minissatélite, de 10 a 64 pares de bases. Esse DNA satélite na maioria das vezes não é transcrito³⁵.

O *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) ou polimorfismo de nucleotídeo único é uma variação na sequência de DNA que ocorre quando um nucleotídeo é alterado por outro em sequências de DNA que podem ou não codificar genes³⁶.

Atualmente, os STRs e SNPs são empregados amplamente para a identificação humana e possuem diferenças relevantes^{18,36}. A análise dos SNPs também pode estar associada aos fenótipos individuais, havendo uma possibilidade futura de identificação de traços físicos como, por exemplo, a cor da íris³⁷.

Jobim *et. al.*, (2006)¹² relatam que os melhores STRs utilizados na identificação humana são aqueles com maior polimorfismo (maior número de alelos), menor tamanho (100 a 200 pares de bases), elevado índice de discriminação e heterozigose, e baixa frequência de mutações. Para isso, há a necessidade dos laboratórios realizarem a frequência genética em pelo menos 100 indivíduos não relacionados.

Eletoforese

A eletroforese é uma metodologia amplamente empregada para a separação, isolamento, análise e manipulação dos ácidos nucleicos. Os ácidos nucleicos possuem uma carga geral total negativa, devido aos seus grupamentos fosfato do arcabouço, conseqüentemente, quando aplicados em um gel de agarose ou poliacrilamida, eles migrarão em direção ao ânodo em um campo elétrico. Em condições apropriadas de tampão, voltagem e miliamperagem, os fragmentos pequenos migrarão mais facilmente do que os maiores.

Atualmente, a eletroforese capilar³⁸ é amplamente utilizada e possui o mesmo princípio que a eletroforese em gel analisados por Laser, com a diferença de que possui capilares para a separação eletroforética dos fragmentos de DNA¹⁸.

Os fragmentos de DNA amplificados por PCR são identificados após a eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido da coloração com prata, ou pela detecção de sinal fluorescente, na qual os iniciadores utilizados no PCR são marcados com fluorocromos, possibilitando a análise por sequenciador automático³⁹.

A variação do tipo e concentração do gel propicia diferentes características de separação, permitindo distintas resoluções e análises. Em caracterização de vínculo genético utiliza-se eletroforese em gel de poliacrilamida ou eletroforese capilar para a análise de imagens. Em inclusão ou exclusão de paternidade, comparam-se os alelos presentes no filho com o do suposto pai, sendo que um seria o alelo obrigatório materno e o outro paterno. O mesmo acontece em inclusão de suspeitos de um crime, no qual se compara o DNA encontrado na vítima, como ocorre com marcas de mordida ou presença de sêmen, ou na cena de um crime. Pode ocorrer uma mistura de amostras biológicas contendo DNA da vítima e do agressor. Dessa maneira, confronta-se o DNA da vítima com o dos suspeitos e, sucessivamente, com o DNA das amostras presentes na cena do crime³⁹.

Géis de agarose ou poliacrilamida podem ser feitos de uma variedade de formas, tamanhos e porosidades e podem ser corridos em um número diferente de configurações. As escolhas desses parâmetros dependem primeiramente do tamanho dos fragmentos a ser separados⁴⁰.

Géis de poliacrilamida são mais eficientes em separações de pequenos fragmentos de DNA (5-500pb), que é o caso da análise do DNA forense, pelo seu poder de resolução ser extremamente alto. Mas, apesar de serem corridos rapidamente e acomodarem comparativamente grandes

quantidades de DNA, géis de poliacrilamida possuem a desvantagem de serem mais difíceis de preparar e manusear do que eletroforese capilar³².

Géis de agarose possuem menor poder de resolução do que géis de poliacrilamida, mas possuem maior alcance de separação. DNAs de 50pb até alguns megabases em extensão podem ser separados em géis de agarose de diferentes concentrações e configurações. Pequenos fragmentos de DNA (50-20000pb) são melhores resolvidos em géis de agaroses corridos em conformação horizontal em campo elétrico de força e direção constantes. Os fragmentos de DNA são comparados com marcadores de tamanho ou *ladders* ou padrões³⁹.

Deve-se ressaltar que a eletroforese capilar é amplamente utilizada em análise de DNA forense, por permitir que grandes quantidades de amostras sejam analisadas de maneira automatizada, além de necessitar de poucas quantidades de amostra para o processo de injeção e podem ser facilmente reinjetadas, se necessário. Separação eletroforética em capilar é realizada em menos de 1 hora, se comparando com as muitas horas necessárias para àquela realizada em géis de poliacrilamida para identificação humana. Além do tempo, a quantidade de passos para a elaboração do gel de acrilamida faz com que possa haver uma chance maior de erro durante a manipulação. A desvantagem é o custo inicial para a compra dos equipamentos, sendo bem mais alta do que aqueles empregados na eletroforese em gel de poliacrilamida¹⁸.

Interpretação dos Resultados do Exame de DNA

Após a visualização, dá-se a análise dos resultados comparando os fragmentos de DNA amplificados das amostras do pai, mãe e filho em caso de paternidade; ou das amostras encontradas na cena do crime, em corpos ou vítimas com as de suspeitos¹⁸.

No entanto, durante a PCR, um grande número de artefatos pode ocorrer e interferir na interpretação e genotipagem dos alelos presentes na amostra de DNA, sendo visualizadas somente após a eletroforese¹⁸.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com uma incrível sensibilidade e poder de discriminação, a análise de DNA tem sido a “figura-chave” e promete grandes progressos da ciência forense, fornecendo aos investigadores uma grande chance de excluir suspeitos que não estão relacionados à cena do crime.

Os métodos baseados na PCR são imediatos, requerem apenas uma pequena quantidade de material e podem fornecer identificação não-ambígua de alelos individuais. Assim, vários métodos de PCR, particularmente os que usam os STRs, estão sendo cada vez mais usados.

A tecnologia do perfil e os métodos relacionados à análise de DNA progrediram a ponto de não colocar em dúvida a admissibilidade dos dados sobre o DNA quando adequadamente coletados e analisados. No futuro, espera-se que as técnicas de biologia molecular existentes sejam aprimoradas e que novos e melhores métodos para análise sejam desenvolvidos, a fim de que a grande maioria dos casos de investigações forenses cíveis e criminais tenha um desfecho que não possa ser questionado nos tribunais.

REFERÊNCIAS

- 1 DUARTE, F. A. M.; PEREZ, A. M.; PENA, S. D.; DE BARROS, M. P. M.; ROSSI, E. O. A *avaliação do DNA como Prova Forense. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2001. 283p.*
- 2 BENECKE, M. *DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. Naturwissenschaften*, v. 84. pp. 181 - 188, 2002.
- 3 BROWN, T.A. *Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma introdução. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2001. 376p.*
- 4 PENA, S. D.J. *Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. In: Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas, v. 20, p. 447 - 460, 2005.*
- 5 MALAGHINI, M.; ALONSO, C. A.M.; DALL' STELLA, R.; SCHNEIDER, V.J. *Análises de Material Genético na Investigação Criminal – um relato sobre a evolução dos processos de padronização. Disponível em: http://www.labfa.com.br/texto_informatgencriminal.htm.*
- 6 BORÉM, A.; FERRAZ, D. A.; SANTOS, F. *DNA e Direito. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília-DF, nº22, p.42-44, set/out, 2001.*
- 7 PRIMORAC, D.; SCHANFIELD, M. S. *Application of Forensic DNA Testing in the Legal System. Croatian Medical Journal*, v. 41, n. 1, p. 32 - 46, 2000.
- 8 ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell, 4th edition. New York: Garland Science; 2002.*
- 9 WIEMANN, M; WINKLER, L; BINGMANN, D. *Light microscopic methods to study cells on non-transparent materials. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, V. 32, Issue 12, p. 976–983, Dec/2001.*
- 10 LUFTIG, M. A., RICHEY, S. *DNA and Forensic Science. New England. Law Review. Vol. 35:3; 2001*
- 11 FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION (FBI). *Handbook of forensic services: Evidence examinations – DNA general. Disponível em: <http://www.fbi.gov/hq/lab/handbook/examsdna.htm>*
- 12 JOBIM L. F. *Identificação humana pelo DNA. In: JOBIM L. F.; COSTA E. S.; Identificação humana vol II. 2006, pp. 3 – 100.*
- 13 LIMA. Renata de Barros. *Biolixiviação de Concentrado de Flotação de Sulfetos de Cobre. Orientadores: Profª. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite e Prof. Dr. Luis Gonzaga Santos Sobral. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).*

- 14 BJERRE A.; COURT D. S.; LINCOLN.; MORLING N. *Society for Forensic Haemogenetics. Forensic Sci. Int.*: 2001 v 90. pp. 41 – 55.
- 15 KLOOSTERMAN A. D. *Credibility of forensic DNA typing is driven by stringent quality Standards.*: 2001. pp. 6 – 409 – 414.
- 16 BRETTELL T. A.; BUTLER J. M.; SAFERSTEIN R. *Forensic science. Anal Chem.*: 2005. pp. 60 – 38 – 39.
- 17 ALBUQUERQUE, T. K. Identificação humana através de marcadores moleculares. Caderno La Salle XI, Canoas, v. 2, n. 1, p. 265 - 270, 2004.
- 18 BUTLER, J. M. *Short tandem repeat analysis for human identity testing.* Current Protocols in Juman Genetics.: 2005. pp. 1 – 4 – 14 – 22.
- 19 COMMITTEE ON DNA FORENSIC SCIENCE. *The evaluation of forensic DNA evidence.* Washington: National Academy Press, 1996.
- 20 INTERNACIONAL CRIMINAL POLICE ORGANIZATION (INTERPOL). *INTERPOL handbook on DNA data Exchange and practice.* Disponível em: <http://www.interpol.int/Public/Forensic/HandbookPublic.pdf>.
- 21 ALONSO, A. et al. Challenges of DNA Profiling in Mass Disaster Investigations, Croatian Medical Journal 2005;46(4):540-548
- 22 LEE, H. C.; LADD, C. Preservation and Collection of Biological Evidence. Croatian Medical Journal, v. 42, n. 3, p. 225 - 228, 2001.
- 23 BONACCORSO, Norma. Análise Forense de DNA. São Paulo: 2004. 24p. Tese (Monografia apresentada no Concurso de Ingresso para professor da ACADEPOL) – Academia de Polícia de São Paulo. Disponível em: <http://www.peritocriminal.com.br/dnaforense.htm>
- 24 SCHNEIDER P. M.; MARTIN P. D. *Criminal DNA databases; the European situation.* Forensic Sci. Int.: 2004. pp. 119 – 232.
- 25 HALLENBERG C.; MORLING N. *A Group of the International Society for Forensic genetics.* Forensic Sci. Int.: 2001. pp. 23 – 33.
- 26 PROMEGA Corporation, 2009.
- 27 INTERNACIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS (ISFH). *Recommendations of the DNA commission of the internacional society for forensic haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphism.* Forensic Sci. Int.: 2002. pp. 55.
- 28 MANDREKAR M. N.; ERICKSON A. M.; KOPP K.; et al. *Development of a human DNA quantitation system.* 2001. pp. 42 – 336.
- 29 ANDERSON S. et al. *Sequence and organization of the human mitochondrial genome.* Nature, 2002 pp. 65 - 457.
- 30 ANDERSEN J. *Quantification of DNA by slot-blot analysis.* In: Lincoln PJ, Thompson J. *Methods in molecular biology, vol, 98: Forensic DNA profiling protocols.* Totowa: Humana Press; 2003. pp. 19 - 26.
- 31 SAIKI R. K.; SCHARF S.; FALOONA F.; et al. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science: 2001. pp. 20; 230 – 1350 – 4.
- 32 SAMBROOK, J.; *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001. 3.ed.

- 33 JEFFREYS A. J.; WILSON V.; THEIN S. L. *Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA*. *Nature*.: 2002. pp. 7 – 13 – 67 – 73.
- 34 EDWARDS A.; *et al.* *DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats*.: 2006. pp. 746 – 56.
- 35 NELEMANN L. J.; MOLLER A.; MORLING N. *PCR typing of DNA fragments of the short tandem repeat (STR) system in Danes and Greenland Eskimos*. *Forensic Sci. Int.*: 2004. pp. 6 – 45 – 51.
- 36 GILL P. *et al.* *Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework*. *Electrophoresis*.: 2005. pp. 1543 – 52.
- 37 FRUDAKIS T. *et al.* *Sequences associated with human Iris pigmentation*. *Natural Genetics*.: 2003. pp. 2071 – 83.
- 38 PEARCE M. J.; WATSON N. D. *Rapid analysis of PCR components and products by acidic non-gel capillary electrophoresis*. 2003. pp. 67 – 117 – 24.
- 39 SULLIVAN K. M.; POPE S.; GILL P.; Robertson J. M. *Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products*. *PCR methods Appl.*: 2002. pp. 1 – 2 – 34 – 40.
- 40 FORNEY, L.J. *et al.* *Structure of microbial communities in activated sludge: potential implications for assessing the biodegradability of chemicals*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, n. 1, p. 40-53, 2001.