

O impacto das técnicas de biologia molecular na resolução de crimes

The impact of molecular biology techniques on crime resolution

DOI:10.34117/bjdv7n12-307

Recebimento dos originais: 12/11/2021

Aceitação para publicação: 09/12/2021

Mariana Lins Araujo Carvalho

Graduanda em Biomedicina, Centro Universitário Vale do Ipojuca (UNIFAVIP)
Av. Adjair da silva Casé, 800. Bairro: Indianópolis, Cidade: Caruaru, Estado:
Pernambuco
E-mail: mari.lac@hotmail.com

Débora Cândido Miranda

Graduanda em Biomedicina, Centro Universitário Vale do Ipojuca (UNIFAVIP)
Av. Adjair da silva Casé, 800. Bairro: Indianópolis, Cidade: Caruaru, Estado:
Pernambuco
E-mail: deboramiranda1011@gmail.com

Moisés Thiago de Souza Freitas

Doutor em Genética, Universidade Federal de Pernambuco
Centro Universitário Vale do Ipojuca (UNIFAVIP) Av. Adjair da silva Casé, 800.
Bairro: Indianópolis, Cidade: Caruaru, Estado: Pernambuco
E-mail: moisesstsf@hotmail.com

RESUMO

A junção das técnicas de biologia molecular com as ciências forenses trouxe inúmeros benefícios na resolução de crimes. Em cenas de crimes, os investigadores podem obter fluidos corporais, tecidos moles e ossos para extração do material genético. O DNA (Ácido desoxirribonucleico) possui regiões repetitivas que formam uma sequência única em cada indivíduo. Essas sequências são nomeadas conforme seu comprimento, chamadas de VNTRs (Variable Number of Tandem Repeat), que são os LTRs (Long Tandem Repeat) e STRs (Short Tandem Repeat) ou de acordo com as variações presentes na sequência, como os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Em investigações, sejam elas criminais ou civis, o DNA fornece informações que vão desde a identificação de cadáveres a confirmação em testes de paternidade. Através delas, obtêm-se informações como, perfil genético, análises de DNA mitocondrial e cromossomo Y, testes de ancestralidade biogeográfica e pesquisa familiar. As técnicas utilizadas na identificação dos indivíduos são: PCR (*Polymerase chain reaction*), sendo a mais aplicada para amplificação de material genético, onde por meio de primers e variações de temperatura ocorre a desnaturação, anelamento e polimerização da fita na fase da extensão; Eletroforese, técnica que permite a segregação de fragmentos de DNA por tamanho ou peso molecular; Southern blot, conhecida por permitir a hibridização do DNA, facilitando assim, a detecção de STRs, VNTRs e SNPs. Tais técnicas se mostraram imprescindíveis para o desenvolvimento de bancos genéticos, como no Brasil que é usado o BNPG, o qual possui mais de 100 mil perfis já cadastrados e ajudou na resolução de 75 mil casos.

Palavras chave: DNA, biologia molecular, genética forense, perfil genético.

ABSTRACT

The combination of molecular biology techniques with forensic sciences brought numerous benefits in solving crimes. At crime scenes, investigators can obtain bodily fluids, soft tissue and bones to extract genetic material. DNA (Deoxyribonucleic acid) has repetitive regions that form a unique sequence in each individual. These sequences are named according to their length, called VNTRs (Variable Number of Tandem Repeat), which are LTRs (Long Tandem Repeat) and STRs (Short Tandem Repeat) or according to the variations present in the sequence, such as SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). In investigations, whether criminal or civil, DNA provides information ranging from the identification of dead bodies to confirmation in paternity tests. Through them, information such as genetic profile, mitochondrial DNA and Y chromosome analysis, biogeographic ancestry tests and family research are obtained. The techniques used in the identification of individuals are: PCR (*Polymerase chain reaction*), being the most applied for amplification of genetic material, where, through primers and temperature variations, the strand denaturation, annealing and polymerization occurs in the extension phase; Electrophoresis, a technique that allows the segregation of DNA fragments by size or molecular weight; Southern blot, known for allowing DNA hybridization, thus facilitating the detection of STRs, VNTRs and SNPs. Such techniques proved to be essential for the development of gene banks, as in Brazil, the BNPG is used, which has more than 100 thousand profiles already registered and helped in the resolution of 75 thousand cases.

Keywords: DNA, molecular biology, forensic genetics, genetic profile.

1 INTRODUÇÃO

Em 1985, com a descoberta dos minissatélites a ciência forense deu um grande salto em direção a identificação de pessoas com base no DNA deixado para trás em amostras biológicas e objetos encontrados em cenas de crimes, bem como abriu possibilidades para correlacionar essa informação genética a outros casos. Desde então, a ciência forense adotou como propósito auxiliar nas investigações de delitos, por meio de aplicações e técnicas em diversas áreas de conhecimento. Dentre as quais, pode-se destacar a biologia molecular e a genética (BERNATH, 2008; SARDINHA, 2010; DOS SANTOS, 2018).

Atualmente, são utilizados como marcadores moleculares os VNTR (Variable Number of Tandem Repeat), polimorfismo caracterizado por longas sequências de repetições, também chamados de minissatélites, os STRs (Short Tandem Repeats), que são padrões presentes em repetições curtas, chamados de microssatélites e por fim os SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único), marcador genético definido por alterações

pontuais, ou seja, em uma única base nitrogenada causadas por substituição, adição ou deleção. (MCPHERSON; PINCUS, 2012).

Pode-se obter material genético de uma gama de amostras biológicas, como sangue, pêlos, saliva, esperma, tecidos moles, urina, secreções e ossos (CARVALHO, 2009), que serão extraídas e processadas a partir de métodos específicos para posterior uso nas técnicas biomoleculares (OLIVEIRA et al., 2007; MCPHERSON; PINCUS, 2012), como a PCR, onde essas sequências genéticas serão multiplicadas de forma exponencial (SILVA; FRANGIOSA, 2018). Por fim, o DNA obtido pode ser inserido em um banco de perfis genéticos, sendo possível assim, averiguar se o material encontrado pertence a algum suspeito já cadastrado ou se está ligada a alguma evidência de outro crime cometido (CHAGAS; SANTOS, 2016).

Devido à importância das técnicas biomoleculares na resolução e na investigação criminal, este trabalho tem como principal objetivo elucidar as técnicas mais utilizadas, suas metodologias e limitações na área da ciência forense, visando o enriquecimento intelectual da comunidade científica. Este projeto foi feito a luz de Lakatos e Marconi (2017) e Gil (2008) utilizando como base artigos científicos e livros.

2 METODOLOGIA

2.1 TIPO DE ESTUDO

É importante salientar que este estudo é do tipo descritivo, com o intuito de esclarecer e informar as técnicas de biologia molecular utilizadas no âmbito forense a partir de estudos já existentes, sendo assim, a abordagem metodológica é considerada qualitativa. A revisão de literatura é do tipo integrativa, pois abrange a metodologia das técnicas, suas vantagens e desvantagens e explica os benefícios que a integração do banco de perfis genéticos trouxe para o Brasil.

2.2 FONTE DE BUSCA

As fontes de dados juntamente com os procedimentos de pesquisa são classificadas como bibliográficas, e sua obtenção foi feita através de bancos de dados, tais como: NCBI, Pubmed, SciELO. Ademais, foram utilizados livros encontrados na biblioteca virtual do SIA (portal acadêmico universitário), bem como artigos científicos e artigos publicados em revistas encontrados a partir da ferramenta de busca denominada Google Acadêmico, ressalta-se que toda a pesquisa da revisão de literatura deste projeto fora realizada no período entre março e maio de 2021.

2.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Como critérios de inclusão o material selecionado estava: em português, espanhol ou inglês; detalhava sobre o DNA e a utilização dos seus marcadores na ciência forense; apresentava a metodologia das técnicas mais utilizadas para análises forenses e explicava os prós e contras das mesmas. Em contrapartida, foram descartados os materiais cujo idioma diferisse dos citados no critério de inclusão; artigos incompletos e resumos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 DNA (ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO)

O Ácido desoxirribonucleico (DNA), é onde se encontra toda informação gênica em organismos eucariontes e procariontes. Esse polímero de nucleotídeos, presente no núcleo celular, normalmente possui formato de dupla fita, embora alguns seres, como vírus, apresentem DNA de fita única. Sua forma molecular é composta por $C_{15}H_{31}N_3O_{13}P_2$, sendo seus nucleotídeos formados por um grupamento fosfato, uma pentose e uma base nitrogenada, denominadas purinas (adenina e guanina) ou pirimidinas (timina e citosina), seu pareamento ocorre entre a adenina e timina, e entre a guanina e citosina unidas por ligações de hidrogênio, conservando assim, sua estrutura de dupla hélice (NCBI, 2021).

3.1.1 Marcadores moleculares

Segundo Alec Jeffreys, cada indivíduo possui um segmento de DNA composto de repetições que formam uma sequência "central", podendo ser identificados por meio desse padrão genômico. Tal segmento apresenta uma grande variação individual, classificadas de polimorfismos de DNA (JEFFREYS; BROOFFIELD; SEMEONOFF, 1985). Os polimorfismos podem ser agrupados de acordo com o seu comprimento ou pela sua sequência e são utilizados como marcadores genéticos (MCPHERSON; PINCUS, 2012).

Cerca de 90% do material genético é composto de DNA não codificante. Dessa porcentagem, 20 a 30% são formados de regiões repetitivas, contendo variação no seu comprimento e de suas repetições centrais, conhecidos como minissatélites e microsatélites e por polimorfismos de sequência, decorrente de alterações em 1 ou mais bases nitrogenadas. Tais alterações podem ser ocasionadas por substituição, adição e deleção de bases ou por regiões de alelos alternativos, sendo mais comuns os SNPs

(Polimorfismos de Nucleotídeo Único), que são alterações pontuais podendo se localizar em regiões repetitivas e não repetitivas da sequência (MCPHERSON; PINCUS, 2012).

A principal diferença entre os minissatélites (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeat* ou LTR – *Repetições Longas em Tandem*) e microssatélites (também chamados de STR – do português “*Repetições curtas em tandem*”) está no tamanho da sequência. Enquanto que os minissatélites apresentam de 500 a 1000 pb (pares de bases), contendo repetições que ocupam 15 a 35 pb do comprimento, os microssatélites são sequências que não ultrapassam 200 pb, abrangendo de 2 a 7 pb repetidos ao longo do seu seguimento (KOCH; ANDRADE, 2008).

3.1.2 Dna forense

No âmbito forense, o DNA pode ser utilizado na identificação de restos humanos acometidos em desastres naturais e de cadáveres (sejam eles carbonizados, em estado de decomposição ou mutilados); na área criminalística, para a resolução de crimes contra a dignidade sexual e avaliação da relação entre suspeito, vítima e objetos, como também pode ser usado na esfera civil para confirmação de testes de paternidade. O DNA pode ser extraído de, basicamente, todo líquido e tecidos corporais (até de objetos que foram tocados, desde que tenha deixado células epiteliais no local) e com apenas 50pcg da amostra é possível detectar esse material genético, através de técnicas específicas (GERARDON, et al., 2018).

Nesse segmento, para a identificação genômica utiliza-se alguns meios, como:

- Perfil de DNA: Através dos padrões gênicos, cria-se um perfil que pode ser comparado ao DNA encontrado nas cenas de crimes com o de suspeitos e sua credibilidade pode ser calculada por estatística (PHILLIPS *et al.*, 2017);
- Perfil de STR: Marcadores que são mais comumente aplicados para gerar o perfil do DNA, são sensíveis, relativamente baratos e estão presentes na maioria dos materiais biológicos. Por meio de suas regiões repetitivas, também são amplamente utilizados para determinação de paternidade (PHILLIPS *et al.*, 2017);
- Análise do cromossomo Y: Cromossomo herdado de origem paterna, sendo assim, pode ser usado em casos de agressão sexual, onde houve mistura de DNA feminino e masculino, já que só o genoma masculino aparecerá durante a análise (PHILLIPS *et al.*, 2017);
- Análise de DNA mitocondrial: Essa organela, responsável pela produção de ATP, contém material genético exclusivamente materno, sendo bastante útil quando amostras de DNA nuclear são limitadas ou foram danificadas. Ademais, mtDNA

possui um bom índice de sobrevivência em amostras antigas ou danificadas (PHILLIPS *et al.*, 2017);

- Análise de SNP: Os SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) são utilizados quando há degradação do DNA, visto que são moléculas menores e mais abundantes do que os STRs (PHILLIPS *et al.*, 2017);
- Pesquisa familiar: Está relacionado a um banco de dados de perfis genéticos, correspondente ao DNA encontrado no local de crime. Durante a busca, se um dado perfil apresenta muitos marcadores semelhantes, é provável que pertençam a mesma família (PHILLIPS *et al.*, 2017);
- Teste de ancestralidade biogeográfica: Por meio das diferenças genômicas dos indivíduos ao redor do mundo, é possível estimar a origem geográfica por essa técnica de amplo espectro, através de marcadores mais ou menos comuns em regiões específicas (PHILLIPS *et al.*, 2017);
- Fenotipagem forense de DNA: É uma técnica recente e que foi usada em poucos casos. Sua função é determinar traços da aparência do indivíduo, como cor de olhos e cabelos, pelos marcadores presente em regiões do DNA que codificam essas características (PHILLIPS *et al.*, 2017);
- Sequenciamento de próxima geração: Técnica nova, que ainda não é muito utilizada no âmbito forense, porém permite que sejam feitos vários testes, citados anteriormente, simultaneamente, facilitando o acesso a uma maior quantidade de informações gênicas em um período de tempo menor (PHILLIPS *et al.*, 2017).

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Durante o processo de identificação genética pode-se afirmar que a etapa mais importante é a extração de DNA, pois é a partir de tal amostra que será feita a reação em cadeia da polimerase (PCR) e as demais técnicas biomoleculares subsequentes utilizadas para a identificação (SILVA *et al.*, 2018). Vários tipos de amostras biológicas podem ser utilizadas para a obtenção de DNA, dentre elas as mais utilizadas são: sangue, pêlos, saliva, esperma, tecidos moles, urina, secreções e ossos (CARVALHO, 2009).

Vale ressaltar a utilização de uma técnica inovadora que utiliza o DNA de toque para a extração de material genético, é sabido que os seres humanos perdem cerca de 400 mil células epiteliais por dia em um processo natural de descamação, e ao tocar ou esbarrar em objetos algumas dessas células podem ser depositadas. São amostras muito sensíveis que devem ser colhidas e armazenadas com extrema cautela, pois a quantidade de material genético é escassa e qualquer tipo de contaminação pode comprometer toda a amostra (NUNN *et al.*, 2013). As formas mais utilizadas para a coleta do DNA de toque consistem em esfregaços secos/molhados de locais sólidos e não porosos (metais, vidros

ou plástico), cortes de estruturas maleáveis ou tecidos onde está a amostra e em seguida submeter o material à uma substância tampão que irá auxiliar no isolamento do material genético presente, bem como a utilização de fita adesiva levantadora e raspagem do local (SILVA *et al.*, 2018).

3.2.1 Métodos de extração de DNA

Fridriszewski *et al.* (2019) elucida que, a extração por si só tem como objetivo separar o DNA de todos os outros componentes intracelulares, bem como das proteínas que estão presentes na sua conformação.

Alguns cuidados devem ser tomados como forma de precaução antes de dar início ao procedimento de extração para evitar a contaminação da amostra, o uso dos EPIs (Equipamento de Proteção Individual) é obrigatório durante todo o procedimento, desde a coleta até o protocolo de extração, e a depender das condições que a amostra estava submetida, o uso de resinas magnéticas pode ser utilizado para minimizar ou eliminar a presença de contaminantes tais como: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e DNA de microrganismos presentes (OLIVEIRA *et al.*, 2007; CARVALHO, 2009).

Existem diversos kits para extração de DNA específicos para cada tipo de amostra, e vários protocolos de extração diferentes como por exemplo o método orgânico, o de Chelex, o de extração em coluna de fase alta, bem como a utilização de pérolas de silicone que são excelentes para a purificação de amostras. No entanto, alguns laboratórios pulam a etapa da extração e analisam a amostra pura, como no caso de amostras de sangues colhidas em FTA cards (papéis filtro tratados especificamente para este fim) a partir de padrões de referência de sangue e bancos de dados (OLIVEIRA *et al.*, 2007; MCPHERSON; PINCUS, 2012).

O método considerado um clássico e mais utilizado é o método orgânico, que pode ser dividido nas três etapas seguintes:

3.2.2 Digestão de DNA

Essa separação inicialmente ocorre por meio da lise da membrana celular em consequência da maceração da amostra (em casos de extração de DNA de tecidos) previamente congelada por nitrogênio líquido que pode ser feita de forma manual ou mecânica através de equipamentos especializados, e para potencializar a desestabilização e ruptura das membranas plasmáticas, a amostra será homogeneizada com uma solução-tampão de lise celular composta por EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), Tris-HCl,

proteínase K, NaCl, SDS (Solução de dodecilsulfato de sódio) e DTT (Ditiotreitol), e posteriormente será submetida ao banho-maria a 50 °C para passar por um processo denominado digestão. Logo após vem a etapa da purificação, ou seja, agora o DNA vai ser completamente isolado de todas as outras macromoléculas e dos demais componentes intracelulares por meio da precipitação e suspensão da amostra em condições adequadas (OLIVEIRA *et al.*, 2007; CARVALHO, 2009; FRIDRISZEWSKI *et al.*, 2019).

3.2.3 Purificação por fenol tamponado

O método de purificação mais utilizado é a extração por fenol tamponado, esta técnica baseia-se na centrifugação da amostra com uma solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico, em proporções 25:24:1 respectivamente, por 10 minutos e logo em seguida o sobrenadante, região onde o DNA estará localizado, será transferido para um novo recipiente. É uma reação baseada no pH da amostra, pois se o fenol utilizado possuir pH menor que 7,0 o material genético vai ser desnaturado e durante a centrifugação ocorrerá sua migração da fase aquosa para a região mais baixa do tubo, a fase orgânica, e assim somente as moléculas de RNA permanecerão no sobrenadante. Dessa forma é imprescindível que o pH esteja próximo de 8,0 para a reação ocorra de forma eficiente (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

3.2.4 Precipitação por etanol

Após a transferência do sobrenadante vai ser utilizado uma solução de etanol absoluto e um sal catiônico, que pode ser cloreto de sódio, acetato de amônio ou acetato de sódio, para auxiliar na precipitação. Oliveira *et al.* (2007) elucida que o etanol possui propriedades que auxiliam na retirada dos resquícios do fenol e do clorofórmio da amostra, e além disso esse composto tem a capacidade de induzir uma transição estrutural, e por consequência ocorre a agregação e precipitação das moléculas do ácido da amostra para o fundo do recipiente utilizado. Em seguida a amostra será centrifugada e seu sobrenadante desprezado, para que estão seja feita a lavagem com etanol a 70%, visando a remoção de resíduos de sais que estejam presentes, posteriormente uma nova centrifugação será realizada, o sobrenadante será novamente desprezado, e por fim o produto remanescente será homogeneizado com uma solução tampão TE (Tris-HCl e EDTA) (MESQUITA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.* 2007).

3.3 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A GENOTIPAGEM DE MARCADORES GENÉTICOS

Há quase 40 anos, as técnicas biomoleculares se tornaram uma peça fundamental para as análises forenses, pois através dos resultados obtidos poderia ser averiguada a culpabilidade de uma pessoa em um crime ou a sua inocência, bem como a identificação de restos mortais e solucionar trocas de bebês em berçários. Partindo do princípio que o genoma humano só é idêntico entre irmãos gêmeos univitelinos, as análises de DNA são peças chaves para a identificação da maior parte da população, pois ao fazer o diagnóstico e mapeamento genético é possível identificar os polimorfismos específicos de cada indivíduo (KOCH; ANDRADE, 2008).

Dentre as técnicas utilizadas nas análises forenses, destacam-se a Reação em Cadeia Polimerase (PCR), a eletroforese e a hibridização por Southern blot.

3.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Em 1980 o pesquisador Kary Mullis criou a reação em cadeia da polimerase, também chamada de PCR (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2015). É uma técnica *in vitro* conhecida por multiplicar de forma exponencial uma sequência-alvo (molde ou *template*) de DNA, e a partir do estabelecimento dessas sequências era possível designar os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos que seriam utilizados durante a reação (SILVA; FRANGIOSA, 2018).

Um grande marco na técnica foi a utilização de dideoxynucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddTTP e ddCTP) como análogos dos deoxynucleotídeos (dATP, dGTP, dTTP e dCTP), os dois precursores do DNA representam as pares de base que compõem a dupla-fita de material genético, no entanto, os dideoxynucleotídeos possuem como função agir como terminadores de sequência devido à ausência de um grupo –OH na extremidade 3' das suas moléculas. Dessa forma, após ligados a fita do DNA os mesmos não conseguem se ligar a outro par de base, inibindo assim, a atividade da enzima DNA polimerase (FRUEHWIRTH; DELAI; FOLHA, 2015).

3.3.1.1 Metodologia

Inicialmente, há a inserção dos pares dos oligonucleotídeos específicos para a fita de DNA-molde, ou seja, os primers no local onde vai ocorrer toda a reação (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). O aparelho utilizado para a realização da PCR é o termociclador, máquina capaz de regular a temperatura durante todo o

procedimento, bem como sua quantidade de ciclos (KOCH; ANDRADE, 2008), nele a fita de DNA sofrerá desnaturação (rompimento das pontes de hidrogênio) quando a temperatura chegar a 95° C, após a etapa da desnaturação o aparelho irá resfriar até chegar aos 50° C para que os primers consigam se ligar à fita do material genético por um processo chamado de hibridização ou anelamento, posteriormente o equipamento aquece até a marca de 72° C para dar início à fase de extensão, ou seja a polimerização da nova fita de DNA por meio da inserção dos dNTPs e ddNTPs pela enzima DNA polimerase, do sentido 5' para 3' (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010).

Originalmente os ddNTPs eram associados ao isótopo radioativo ³²P, porém com o passar dos anos a técnica ficou mais moderna e o ³²P foi substituído por fluóforos, cada tipo de ddNTP possui um fluóforo específico. Ao final da replicação, as fitas são inseridas em um tubo com gel poliacrilamida para serem submetidas a uma eletroforese, as bandas separam os fragmentos de DNA por tamanho e sua fluorescência é detectada no final do tubo de forma automatizada. Todas as informações obtidas durante a reação são repassadas para um computador associado para seu armazenamento (ZOLET *et al.*, 2017).

3.3.2 Eletroforese

É uma técnica bioquímica simples, sensível e rápida utilizada para a separação de moléculas de DNA, RNA e proteínas, utilizando como critério as cargas elétricas do material estudado (BRAMMER, 2001; SILVA; FRANGIOSA, 2018). Brammer (2001) ressalta que as proteínas são anfóteras, ou seja, possuem carga positiva ou negativa a depender do pH do meio em que estão inseridas, e por esse motivo faz-se necessário a utilização de uma solução tampão, para manter o pH estável durante toda a eletroforese.

Outra característica que deve ser observada é a temperatura durante a execução da técnica, deve-se sempre monitorar a corrente elétrica para que não ocorra sua intensificação e alteração da temperatura, pois em temperaturas elevadas há a desnaturação de enzimas (proteínas) (BRAMMER, 2001).

3.3.2.1 Metodologia

Carvalho, Ricci e Affonso (2015) elucidam que, inicialmente utiliza-se uma cuba na qual vão ser colocados eletrodos em suas extremidades, tais equipamentos vão conferir o polo positivo e negativo do recipiente. Em seguida uma solução tampão é utilizada com

o intuito de auxiliar os eletrodos na condução do campo elétrico, o gel posteriormente é colocado no centro da cuba de forma que fique submerso na solução tampão.

Os fragmentos de DNA obtidos através da técnica PCR são misturados em uma solução composta por azul de bromofenol (e/ou xilonecianol) e glicerol, essa solução tem como função aumentar a densidade das frações estudadas, impedindo assim, a dispersão da amostra pelo gel, além de conferir uma coloração azulada que auxilia na detecção da migração dos fragmentos. Dando continuidade, as frações de DNA (ou RNA ou proteínas) são pipetadas em poços, previamente preparados com um pente, no gel de agarose ou poliacrilamida, e em seguida um potencial elétrico é acionado (CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2015).

Sabe-se que as moléculas de DNA possuem carga negativa, dessa forma, conseqüentemente serão atraídas para o polo positivo. O peso ou tamanho molecular possuem direta influência na velocidade que os fragmentos do ácido desoxirribonucleico vão migrar pelo gel, de modo que os menores vão cobrir uma maior distância no gel e vice-versa. Ao final da técnica o gel é exposto a um transiluminador para observação do resultado, em suma o aparelho detecta as distâncias totais percorridas pelos fragmentos e em seguida faz comparação dos dados, para que ocorra a separação por tamanho, e em seguida o resultado é documentado por meio de sistemas de fotografias com filtro UV (SILVA; FRANGIOSA, 2018; CARVALHO; RICCI; AFFONSO, 2015).

3.3.3 Southern blot

Esta técnica foi desenvolvida por um biólogo britânico chamado Edwin Southern e no âmbito forense é bastante utilizada para a identificação de pessoas pela detecção de STRs, SNPs e VNTRs, bem como testes de paternidade (SILVA; FRANGIOSA, 2018; KOCH; ANDRADE, 2008).

O Southern blot é uma das técnicas mais utilizadas para a hibridização de dois ácidos nucleicos de fita simples. A hibridização consiste em um processo, no qual dois tipos diferentes de moléculas de DNA desnaturadas, seja por alta temperatura ou pH elevado do meio, após serem expostas a um lento processo de resfriamento conseguem renaturar novamente, porém agora formando moléculas híbridas, este princípio também permite a hibridização entre moléculas de RNA e DNA complementares (WATSON *et al.*, 2015).

3.3.3.1 Metodologia

Após a eletroforese o gel é mergulhado em uma solução alcalina de hidróxido de sódio (NaOH) para que os fragmentos de DNA se desnaturem, em seguida uma folha de nitrocelulose é posta por cima do gel, e uma camada de papel absorvente é posta acima da folha. A folha de nitrocelulose vai absorver os fragmentos de DNA por capilaridade, fixando o material genético no mesmo local que estava no gel, enquanto que a camada de papel absorvente irá absorver os líquidos presentes (KOCH; ANDRADE, 2008).

Com o DNA alvo agora fixado à folha, outros fragmentos de DNA não específicos vão ser incubados junto ao material genético estudado para que se liguem aos sítios remanescentes. Se bem escolhidos, essas amostras não específicas não irão causar alterações no procedimento, deixando a sequência gênica de interesse disponível para ligação (WATSON, *et al.*, 2015).

Posteriormente, uma solução contendo as sondas de DNA em fita simples vai ser adicionada a folha de nitrocelulose, tais estruturas são sequências de DNA conhecidas geralmente fixadas a um isótopo radioativo. Após seu umedecimento com as sondas, a nitrocelulose é incubada por algumas horas para permitir a renaturação e ligação das sondas de DNA ao sítio de interesse por hibridização. O local onde houve a hibridização poderá ser observado por diferentes métodos, quando as sondas são ligadas a isótopos radioativos uma autoradiografia é feita utilizando um filme de raio X. O local de interesse será representado por uma mancha escura no filme revelado (KOCH; ANDRADE, 2008).

3.4 VANTAGENS E LIMITAÇÕES

Mesmo sendo técnicas imprescindíveis para a identificação de suspeitos de crimes, algumas limitações foram identificadas. A capacidade da eletroforese em selecionar uma grande quantidade de sequências de DNA de forma automatizada é extremamente útil na ciência forense, contudo a técnica não consegue identificar a sequência de pares de base da amostra estudada, se limitando a segregá-las somente com base no seu tamanho ou peso molecular (SILVA; FRANGIOSA, 2018).

A PCR é uma técnica que de fato revolucionou a ciência forense por sua praticidade, velocidade e principalmente sua sensibilidade. Este procedimento consegue amplificar o DNA de apenas uma célula, sendo assim imprescindível para a análise forense, pois muitas vezes as amostras obtidas são escassas e muitas vezes degradadas. Sua principal limitação é a contaminação, se houver outro DNA contaminante com aproximadamente as mesmas proporções do DNA alvo, os resultados revelados vão ser

inconclusivos ou errôneos (KOCH; ANDRADE, 2008). Além disso, o excesso da amostra de DNA molde pode saturar o procedimento, causando amplificações inespecíficas ou a presença de artefatos, dificultando a análise (FRUEHWIRTH; DELAI; FOLHA, 2015).

A hibridização por Southern blot é usada na área forense para a identificação de STRs, SNPs e VNTRs, auxiliando na identificação de suspeitos, no entanto esta técnica não poderá ser realizada em situações que a amostra analisada encontra-se degradada ou danificada, pois somente pode ser executada com a presença do DNA genômico completo (KOCH; ANDRADE, 2008).

3.5 BANCO NACIONAL DE PERFIS GENÉTICOS (BNPG)

Dias Filho, et.al. (2020) elucidam que a introdução das ciências forenses no Brasil com o intuito de resolver crimes, foi possível devido a instauração do laboratório de DNA criminal da Polícia Civil do Distrito Federal (DF), que ocorreu no ano de 1995. Desse modo, trouxe consigo avanços na área que se expandiram a outros estados. Órgãos como o ministério da justiça (MJ) e a Secretaria Nacional de Segurança Pública (SENASP), foram de grande importância nesse quesito, visto que pretendiam melhorar o desenvolvimento técnico-científico, ademais, foi com o financiamento da SENASP que instalou-se o Plano Nacional da Segurança Pública, e laboratórios de genética forense foram inaugurados por todo território brasileiro.

A inserção do primeiro banco de perfis de dados genéticos, no Brasil, teve início em 2009, pela fundação da Rede Integrada de Bancos de Dados de Perfis Genéticos (RIBPG), mediante o software CODIS (Combined DNA Index System). O CODIS organiza suas informações em índices, sendo eles: o índice forense, onde armazena informações de amostras coletadas em cenas de crime e o índice dos indivíduos que foram condenados, registrando suas informações genéticas (CHAGAS; SANTOS, 2016).

No Brasil, com a adoção do Banco Nacional de Perfis Genéticos (BNPG), houve o fortalecimento do Pacote Anticrime, pois à medida que o RIBPG pode acusar o suspeito, também pode inocentá-lo ou correlacionar sua amostra com outras investigações. A inserção do material genético, é obrigatória a condenados por crimes dolosos, hediondos e de natureza grave contra pessoas ou em casos que sejam determinados pelo juiz (BRASIL, 2019).

Desde a sua implantação no ano de 2013, até o presente ano de 2021, o BNPG brasileiro consta mais de 100 mil perfis genéticos cadastrados, sendo 75 mil de condenados (em maioria por abuso sexual e casos de crimes violentos) e 16 mil de

vestígios encontrados no local de crime. Por meio dele, mais de 2000 investigações foram elucidadas através dos 20 laboratórios estaduais, um do Distrito Federal e um da Polícia federal espalhados pelo Brasil (BRASIL, 2021).

Um exemplo da contribuição do BNPG para a resolução de crimes, foi a condenação de um dos acusados de participar de um assalto a empresa de transporte, ocorrido em São Paulo no ano de 2016. O suspeito foi preso em Pernambuco, em 2019. No ano de 2020, ao inserir seu material genético no banco, foi constatado que o mesmo já tinha seu DNA relacionado a 5 locais de crime diferentes: Santos-SP, Ciudad del Este-Paraguai, Jacareí-SP, Suzano-SP e Blumenau-SC, levando o réu a um tempo de prisão maior (146 anos) por associação criminosa, latrocínios e roubos (BRASIL, 2021).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos realizados durante a elaboração deste artigo, pode-se afirmar que a PCR é a técnica de sequenciamento genético mais utilizada por seu baixo custo, rápida execução e por possuir uma alta sensibilidade, sendo assim imprescindível para análises forenses pois é capaz de sequenciar amostras de DNA escassas e/ou degradadas. Além disso, é um procedimento chave já que os seus produtos serão utilizados para a execução de técnicas complementares como a Eletroforese e o Southern blotting, com o objetivo final de identificar autores de crimes.

Os polimorfismos também são excelentes ferramentas no meio forense pois a partir deles é possível fazer uma gama de análises mais específicas, das quais destacam-se: a análise de DNA mitocondrial, a análise do cromossomo Y, a pesquisa familiar, a fenotipagem forense de DNA e principalmente o desenvolvimento de perfis genéticos por STRs, marcador bastante utilizado não só para esse propósito, mas também por serem sensíveis, baratos e a partir de suas repetições são capazes de realizar testes de paternidade.

Deste modo, pode-se afirmar que a biologia molecular possui grande relevância na ciência forense, pois além de fornecer provas confiáveis no âmbito jurídico, ela possui como um dos seus principais produtos a criação de bancos de perfis genéticos. Todavia é pertinente estimular a pesquisa e busca de aperfeiçoamento nas técnicas já conhecidas, bem como o desenvolvimento de novas técnicas para que a genética molecular se torne uma prova mais precisa e irrefutável nos tribunais.

REFERÊNCIAS

BERNATH, Viviana. El ADN como herramienta para la resolución de procesos judiciales. Pasado, presente y futuro. *Quimica Viva*, v. 7, n. 2, p. 103-112, 2008. Disponível em: <<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v7n2/bernath.pdf>>. Acesso em: 29 mar. 2021.

BRAMMER, S. P. A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas. Embrapa Trigo-Documents (INFOTECA-E), 2001. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/852459/1/pdo06.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2021.

BRASIL, Ministério Da Justiça e Segurança Pública, Governo Federal, Banco Nacional de Perfis Genéticos do Ministério da Justiça e Segurança Pública ultrapassa 100 mil perfis cadastrados, Brasília, 11/03/2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/mj/pt-br/assuntos/noticias/banco-nacional-de-perfis-geneticos-do-ministerio-da-justica-e-seguranca-publica-ultrapassa-100-mil-perfis-cadastrados>>. Acesso em 21 maio 2021.

BRASIL, Ministério Da Justiça e Segurança Pública, Governo Federal, Banco Nacional de Perfis Genéticos: uma ferramenta eficiente para elucidação de crimes, Brasília, 25/04/2019. Disponível em: <<https://www.justica.gov.br/news/collective-nitf-content-1556212211.45>>. Acesso em 21 maio 2021.

CARVALHO, C. V.; RICCI, G.; AFFONSO, R. Guia de Práticas em Biologia Molecular. 2. ed., São Caetano do Sul, SP: Yendis, 2015.

CARVALHO, Hérica Geovânia de Araújo. Extração de DNA de ossos humanos, sem pulverização, para uso em identificação forense. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1582/1/arquivo1563_1.pdf>. Acesso em: 29 out. 2021.

Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (2021). Resumo do composto PubChem para CID 44135672, ácido desoxirribonucleico. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Deoxyribonucleic-acid>>. Acesso em: 12 maio 2021.

CHAGAS, SANTOS. REVISTA CML CRIMINALÍSTICA E MEDICINA LEGAL. V.1. N.1. BELO HORIZONTE. ARTIGO: A lei 12.654/12 e os novos desafios para a perícia criminal na área de biologia forense em Minas Gerais. 2016. Disponível em: <<http://www.revistacml.com.br/wp-content/uploads/2017/01/REVISTA-CML-N1.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2021.

DIAS FILHO, et.al. Introdução à biologia forense. 1 edição. Millennium Editora, 2020. Disponível em: <<https://www.editorajuspodivm.com.br/cdn/arquivos/052364b608ee71d56fea22d0508ff90a.pdf>>. Acesso em: 03 abr. 2021.

DOLINSKY, Luciana Cresta; PEREIRA, L. M. C. V. DNA forense. Saúde e ambiente em Revista, v. 2, n. 2, p. 11-22, 2007. Disponível em: <http://www.biologia.bio.br/curso/2%C2%BA%20per%C3%ADodo%20Faciplac/Gen%C3%A9tica/DNA%20forense_artigo%20de%20revis%C3%A3o.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2021.

DOS SANTOS, Anderson Eduardo. As principais linhas da biologia forense e como auxiliam na resolução de crimes. *Revista Brasileira de Criminalística*, v. 7, n. 3, p. 12-20, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Anderson-Eduardo-Santos/publication/328642218_As_principais_linhas_da_biologia_forense_e_como_auxilia_m_na_resolucao_de_crimes/links/5c7f37b2299bf1268d3ce231/As-principais-linhas-da-biologia-forense-e-como-auxiliam-na-resolucao-de-crimes.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2021.

FRIDRISZEWSKI, Bruna Margutti et al. Otimização de protocolos de extração de DNA em laboratório de biologia molecular. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/204042/OTIMIZA%20c3%87%20c3%83O%20DE%20PROCOLOS%20DE%20EXTRA%20c3%87%20c3%83O%20DE%20DNA%20EM%20LABORAT%20c3%93RIO%20DE%20BIOLOGIA%20MOLECULAR.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 30 out. 2021.

FRUEHWIRTH, Marcelo; DELAI, Robson Michel; FOLHA, A. R. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas a Perícia e Ciência Forense. *Derecho y Cambio Social*, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Marcelo-Fruehwirth/publication/317087477_TECNICAS_DE_BIOLOGIA_MOLECULAR_APLICADAS_A_PERICIA_E_CIENCIA_FORENSE/links/5924f0e9aca27295a8c2d49f/TECNICAS-DE-BIOLOGIA-MOLECULAR-APLICADAS-A-PERICIA-E-CIENCIA-FORENSE.pdf>. Acesso em: 19 maio 2021.

GERARDON, B. B. et al. *Biologia molecular e biotecnologia*. Porto Alegre, RS: Grupo A, 2018.

GIL, Antonio Carlos. *Métodos e técnicas de pesquisa social*. 6. ed. Editora Atlas SA, 2008. Disponível em: <<https://ayanrafael.files.wordpress.com/2011/08/gil-a-c-mc3a9todos-e-tc3a9nicas-de-pesquisa-social.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2021.

JEFFREYS, Alec J.; BROOKFIELD, John FY; SEMEONOFF, Robert. Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature*, v. 317, n. 6040, p. 818-819, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/317818a0>>. Acesso em 15 maio 2021.

KOCH, Analara; ANDRADE, Fabiana Michelsen de. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. *Rbac*, v. 40, n. 1, p. 17-23, 2008. Disponível em: <https://moodle.ufsc.br/file.php/19765/topico_vii/genetica_forense-1.pdf>. Acesso em: 21 maio 2021.

MARCONI, Marina de Andrade; LAKATOS, Eva Maria. *Fundamentos de metodologia científica*. 5. ed.-São Paulo: Atlas, 2003. Disponível em: <http://docente.ifrn.edu.br/olivianeta/disciplinas/copy_of_historia-i/historia-ii/china-e-india/view>. Acesso em: 26 mar. 2021.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. *Diagnósticos Clínicos E Tratamento POR Métodos Laboratoriais de Henry*, 21 ed., São Paulo: Manole, 2012. cap. 73. p.1520.

MESQUITA, Ricardo Alves et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesquisa Odontologica Brasileira*, v. 15, n. 4, p. 314-318, 2001. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pob/a/hRPLPGHVL3JpcPwx9trPZHLx/?format=pdf&lang=en>>. Acesso em: 30 out. 2021.

NASCIMENTO, Sabrina; SUAREZ, Eloah Rabello; PINHAL, Maria Aparecida da Silva. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. Revista Brasileira de Medicina, v. 67, p. 7-19, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Eloah-Rabello-Suarez/publication/284719832_Tecnologia_de_PCR_e_RT-PCR_em_tempo_real_e_suas_aplicacoes_na_area_medica/links/5657100d08aefe619b1ed434/Tecnologia-de-PCR-e-RT-PCR-em-tempo-real-e-suas-aplicacoes-na-area-medica.pdf>. Acesso em: 19 maio 2021.

NUNN, Samuel. Touch DNA collection versus firearm fingerprinting: comparing evidence production and identification outcomes. J Forensic Sci. 2013 May. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1556-4029.12119>>. Acesso em: 29 out. 2021.

OLIVEIRA, MC de S. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE), 2007. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>>. Acesso em: 30 out. 2021.

PHILLIPS, C. et al. 2017. "Making Sense of Forensic Genetics." London. Disponível em: <http://senseaboutscience.org/wp-content/uploads/2017/01/Making-Sense-of-Forensic-Genetics.pdf>. Acesso em 21 maio 2021.

SARDINHA, Patrícia de Fátima Caeiro. Coleções de história natural como fonte de ADN degradado: teste de protocolos moleculares com aplicação à genética forense. 2010. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/2350/1/ulfc090527_tm_Patricia_Sardinha.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2021.

SILVA, Tiago Aparecido; FRANGIOSA, Paulo César. 5. A aplicação de técnicas moleculares de DNA na investigação forense. Revista Científica UMC, v. 3, n. 2, 2018. Disponível em: <<http://seer.umc.br/index.php/revistaumc/article/view/246>>. Acesso em: 18 maio 2021.

SILVA, Rosana Coutinho Freire et al. Desenvolvimento de kit e protocolo alternativos para coleta e extração de DNA de amostras forenses e restos mortais degradados. 2018. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/3819/3/Desenvolvimento%20de%20kit%20e%20protocolo%20alternativos%20para%20coleta%20e%20extra%20de%20DNA%20de%20amostras%20forenses%20e%20restos%20mortais%20degradados.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2021.

WATSON, J.D. et al. Biologia Molecular do Gene. 7.ed., Porto Alegre, RS: Artmed, 2015.

ZOLET, Andreia Carina Turchetto et al. Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. 2017. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/206114/001056131.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 18 maio 2021.