

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO
LABORATÓRIO DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL EM TÉCNICAS LABORATORIAIS
EM SAÚDE

Julia Pessanha Valente

IDENTIFICAÇÃO HUMANA:
a importância do DNA para a criminalística

Rio de Janeiro

2009

Julia Pessanha Valente

IDENTIFICAÇÃO HUMANA:
a importância do DNA para a criminalística

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio como requisito parcial para aprovação no curso técnico de nível médio em saúde com habilitação em Laboratório de Bodiagnóstico em Saúde.

Orientador: Emanuele Amorim Alves

Rio de Janeiro

2009

Julia Pessanha Valente

IDENTIFICAÇÃO HUMANA:
a importância do DNA para a criminalística

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio como requisito parcial para aprovação no curso técnico de nível médio em saúde com habilitação em Laboratório de Bodiagnóstico em Saúde.

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

(Emanuele Amorim Alves - Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio / Fundação
Oswaldo Cruz)

(Daniel Santos Souza - Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio / Fundação Oswaldo
Cruz)

(Daniele Ramos Rocha - Escola Nacional de Saúde Pública / Fundação Oswaldo Cruz)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
os amores da minha alma.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que sempre me deu forças para continuar nos momentos que eu mais precisei e me abençoou com uma estrutura familiar impecável.

Aos meus pais Sueli e Ricardo, que sempre me deram apoio e amor em todos os momentos da minha vida e tiveram muita paciência nos momentos mais difíceis, sempre acreditando no meu potencial.

A toda minha família, parte indispensável em minha vida.

A todos os meus verdadeiros amigos da Turma 2007 da EPSJV, por me darem forças e alegrias pra continuar, mesmo quando a vontade de desistir foi enorme.

A minha orientadora, Emanuele Alves, por seu apoio na elaboração deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram na elaboração e conclusão deste trabalho e minha falha memória não recorda.

“A identificação positiva através do perfil de DNA é um fato. Não trata-se de algo subjetivo ou influenciado pelas variações das emoções humanas.”
(William Sessions)

RESUMO

O DNA (Ácido Desoxirribonucléico) é uma molécula presente no interior do núcleo de todas as células, responsável por orientá-las na fabricação de proteínas que determinarão todos os traços biológicos e informações necessárias para formação de um novo organismo vivo. A genética forense, em suas diversas áreas de atuação, está em constante processo de avanços tecnológicos, buscando meios cada vez mais eficientes de identificar amostras de material genético encontradas em locais de crime, se mostrando cada vez mais confiável e eficaz na busca e validação de provas científicas e concretas de uma investigação. O DNA, responsável pela hereditariedade, possui alto poder discriminatório, mostrando-se vantajosa quando utilizada como base para testes de identificação, pois ao contrário de métodos mais rudimentares antes utilizados, é necessária uma ínfima quantidade de qualquer tipo de material biológico, o que permite uma gama de possibilidades muito maior de resolução, além de ser muito mais resistente a fatores ambientais. O presente trabalho busca entender o funcionamento dos principais métodos de identificação humana através do DNA, considerando sua importância para a ciência forense e a criminalística, apontando o funcionamento das principais técnicas utilizadas e os impactos de seus resultados sobre casos jurídicos.

Palavras-chave: Identificação Humana, DNA, Forense

ABSTRACT

DNA (Deoxyribonucleic Acid) is a molecule which is present inside the nucleus of all cells, and it is responsible for guiding them through the manufacture of proteins that determine all biological traits and information that are necessary to form a new living organism. The forensic genetics, in its various areas, are constant undergoing technological advances, by searching for efficient techniques to identify samples of genetic material found at crime scenes, and proving to be increasingly confident and effective in finding and validating scientific and concrete evidences of an investigation. The DNA, responsible for heredity, has a high discriminatory power and it proved to be beneficial when used as a basis for identification tests, as opposed to more rudimentary methods used in the past, needing only a tiny amount of any biological material, allowing a range of possibilities with higher resolution, and is much more resistant to environmental factors. This paper seeks to understand the operation of the main methods of identification through human DNA, considering its importance to forensic science and criminalistics, pointing the operation of the main used techniques and the impacts of their results on legal cases.

Keywords: Human Identification, DNA, Forensic

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Coleta de medidas biométricas pelo método Bertillonage.....	13
Figura 2: Padrões de impressões digitais.....	14
Figura 3: Esquema da estrutura de um nucleotídeo.....	15
Figura 4: Dupla Hélice do DNA e seus componentes estruturais.....	16
Figura 5: Processos de duplicação, tradução e transcrição e seus produtos.....	17
Figura 6: Representação de um cromossomo.....	18
Figura 7: Cromossomos humanos aos pares segundo classificação convencional.....	19
Figura 8: Representação do DNAm.....	24
Figura 9: Técnica de separação por eletroforese.....	34
Figura 10: Esquema de RFLP para fins forenses.....	36
Figura 11: Esquema da reação de PCR.....	39
Figura 12: Representação da técnica de Nested PCR.....	40
Figura 13: Esquema de PCR em tempo real.....	41
Figura 14: Esquema da reação de RT-PCR.....	44
Figura 15: Uso de fingerprinting para casos de elucidação de paternidade.....	45

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desorribonucleotídeo Trifosfatado
EDTA	Ácido Tetracético Etilenodiamino
FBI	<i>Federal Bureau of Investigation</i>
G	Guanina
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HCL	Ácido Clorídrico
INTERPOL	<i>International Criminal Police Organization</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mPCR	PCR Multiplex
mtDNA	DNA mitocondrial
n	Número de repetições
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RFLP	Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da Transcriptase Reversa
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SP	São Paulo
SSP	Secretaria de Segurança Pública
STR	Repetições curtas em <i>tandem</i> ou Microsatélite
T	Timina
VNTR	Número Variável de Repetições em <i>tandem</i> ou Minissatélite

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 HISTÓRICO.....	12
1.2 ESTRUTURA DO DNA.....	15
1.3 O DNA E A SÍNTESE PROTEICA.....	16
1.4 TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA.....	17
1.5 O DNA COMO FERRAMENTA DE IDENTIFICAÇÃO.....	19
1.6 MARCADORES MOLECULARES.....	21
1.7 DNA MITOCONDRIAL NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA.....	23
1.8 CROMOSSOMO Y NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA.....	24
2 OBJETIVO	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 AMOSTRAGEM	27
3.1.1 Aspectos Jurídicos.....	27
3.1.2 Materiais.....	28
3.1.3 Coleta e Armazenamento.....	30
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	31
3.3 TÉCNICAS.....	33
3.3.1 RFLP.....	33
3.3.2 PCR.....	36
3.3.2.1 <i>Tipos de PCR</i>	39
3.3.2.1.1 <i>Nested PCR</i>	39
3.3.2.1.2 <i>PCR em Tempo Real</i>	40
3.3.2.1.3 <i>PCR Multiplex</i>	42
3.3.2.1.4 <i>RT-PCR</i>	42
3.3.3 DNA Fingerprinting.....	44
3.3.4 DNA Mitocondrial.....	45
3.3.5 Cromossomo Y.....	46
4 DISCUSSÃO	47
5 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Independente dos avanços, até então completamente desconhecidos da ciência forense, sociedades de todos os períodos históricos reconheciam a necessidade de estigmatizar os criminosos.

Se antes estes eram apontados através de marcas com ferro em brasa, iniciais do crime cometido assinaladas na testa, cortes na orelha ou secção das narinas, atualmente é adotada a fixação da personalidade jurídica de um indivíduo para os atos de sua vida pública ou privada. Ao longo do tempo os métodos de identificação foram sendo cada vez mais refinados, a fim de assegurar com precisão a identidade de um ser humano (BARALDI,2008).

Em 1664, Marcello Malpighi despercebidamente começou a desvendar uma das que seria a forma de identificação mais utilizada atualmente. Com o auxílio do então recém inventado microscópio ele percebeu cumes elevados na superfície do tecido epitelial, chegando a descrevê-los como “da laçada a espirala”. Porém, na época o professor universitário de anatomia não fez nenhuma menção de seu valor como ferramenta de identificação (COSTA et al, 2005).

Em 1823, o também professor universitário de anatomia Johannes Evangelista Purkinje, publicou uma tese, de sua autoria, onde citava nove padrões de impressões digitais, entretanto não mencionou relações envolvendo estas como método de identificação, apenas deixou o caminho ainda mais aberto para futuras descobertas nesse campo (COSTA et al, 2005).

O francês Alphonse Bertillon cria, em 1879, o primeiro método científico de identificação, amplamente aceito e conhecido como Bertillonage, com bases fundamentadas na antropometria (Figura 1). O sistema era complexo e completo, conferia numa combinação de medidas físicas coletadas por procedimentos prescritos. Suas chaves eram as anotações antropométricas, as descrições de sinais particulares, a fotografia do identificado de frente e de perfil e as impressões digitais, introduzidas apenas em 1894 obedecendo uma classificação original, mas cumprindo um papel de mero elemento de identificação (COSTA et al, 2005).

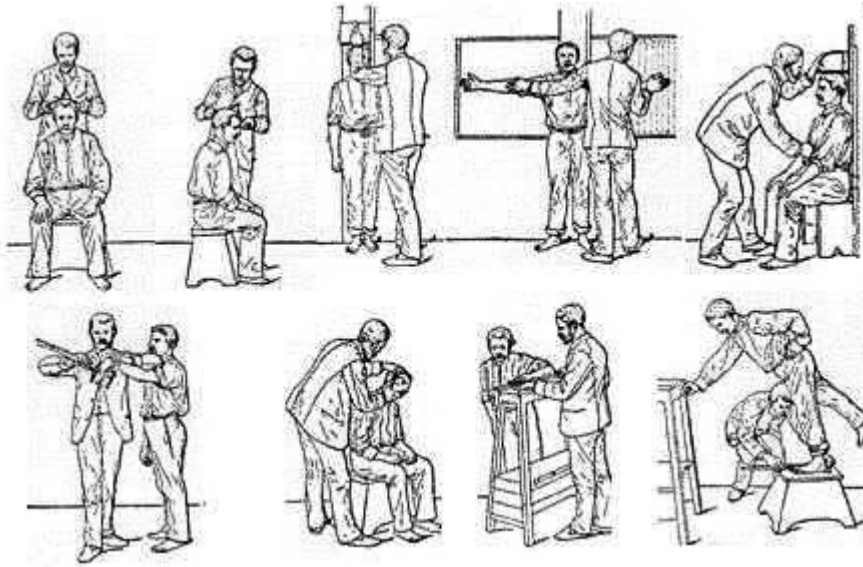


Figura 1: Coleta de medidas biométricas pelo método Bertillonage. Fonte: http://images.google.com.br/imgres?imgurl=http://papiloscopia.com.br/Historia_arquivos/Image5.jpg. Acesso em 23 Nov .2009.

Porém, esse sistema de individualização baseado nas medidas de certas partes do corpo humano e suas peculiaridades fisionômicas foi posto abaixo pelo argentino Juan Vucetich Kovacevich, que apresentou argumentos que apontavam insegurança e deficiências em tal método, e logo a seguir, com base em estudos realizados por Francis Galton sobre impressões digitais, criou seu sistema datiloscópico universalmente reconhecido como infalível (COSTA et al, 2005).

Em seus experimentos, Vucetich estudava a identificação humana através das impressões digitais. Ele precedia a tomada das impressões digitais dos dez dedos, e eram usados símbolos literais para representação dos dedos polegares e para os demais oito eram empregados símbolos numerais. Como todos os dedos de um indivíduo diferem entre si, e não existem duas pessoas que apresentem impressões digitais exatamente coincidentes, esse simples método se mostra eficiente para descoberta de identidades de criminosos que deixaram para trás alguma impressão digital enquanto cometiam delitos (GRECO, 2009).

A gordura natural da pele humana faz com que o mais breve contato com uma superfície lisa deixe uma marca, uma impressão digital. Fruto do código genético, ela se forma no útero materno com a movimentação do feto. Composta por uma série de traços na superfície dos dedos, mantém-se inalterada por toda a vida, e apesar da infinita variação dos traços, pode ser classificada em três tipos: arcos, laços e espirais (Figura 2). Vários estudos comprovam que estas possuem características únicas e intransferíveis, então, a partir de tal afirmação, a idéia de identificar criminosos por meio de suas impressões digitais, lançada em 1877 pelo microscopista Thomas Taylor, foi aprimorada pelo médico britânico Henry Faulds

e mais tarde pelo próprio Vucetich, sendo até hoje empregada em diversos países como uma das principais formas de identificação (GRECO, 2009).



Figura 2: Padrões de impressões digitais. Adaptado de www.howstuffworks.com. Acesso em 24 Out. 2009.

Os ácidos nucléicos foram descobertos, em 1869, por Friedrich Miescher, um jovem médico suíço. Através de técnicas notavelmente avançadas para época, Miescher isolou, de núcleos de células de pus e esperma de salmão, uma macromolécula, até então nunca identificada, a qual chamou de nucleína e posteriormente, ácido nucléico. No século XX, o bioquímico Albrecht Kossel evidenciou a existência de dois tipos de ácidos nucléicos: o ácido desoxirribonucléico (ADN ou DNA) e o ácido ribonucléico (ARN ou RNA) (REMUALDO, 2004).

Ácidos nucléicos são moléculas de extrema importância para os seres vivos, pois além de regular os processos vitais dos organismos, são responsáveis pela hereditariedade e proporcionam um alto grau de variabilidade entre indivíduos (REMUALDO, 2004).

O avanço da ciência nos campos tecnológicos possibilitou o desenvolvimento de técnicas que utilizam o DNA, como método de identificação humana. A individualidade das características de cada pessoa permite que haja uma peculiaridade e alta discriminação do DNA encontrado em todas as células. Devido a esse alto poder discriminatório, em somatório a fatores externos e a considerável margem de erros dos outros métodos, as técnicas que utilizam o DNA como fator chave para a obtenção de resultados positivos e confiáveis quanto à identificação de indivíduos, justamente por essa precisão de resultados, tomou o lugar das outras (REMUALDO,2004).

1.2 ESTRUTURA DO DNA

O DNA é uma molécula presente, principalmente, no interior do núcleo da célula, responsável por orientá-la na fabricação de proteínas que determinarão todos os traços biológicos e informações necessárias para formação de um novo organismo vivo. É encontrado no núcleo de todas as células nucleadas, sendo exatamente o mesmo, não importando o quão diferentes morfologicamente e funcionalmente elas forem. Ele é formado no momento da concepção e jamais mudará, mesmo depois da morte (REMUALDO, 2004).

Ácidos nucléicos são polinucleotídeos, macromoléculas formadas pelo encadeamento de unidades menores chamadas nucleotídeos (Figura 3). Cada um desses nucleotídeos é resultado da combinação de um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada, que pode variar entre purinas (Adenina e Guanina) e pirimidinas (Timina e Citosina). A adenina forma especificamente pontes com a timina, e a guanina com a citosina. Para cada nucleotídeo de adenina existe uma timina (A-T), e para cada nucleotídeo de citosina existe uma guanina (C-G), formando assim cadeias complementares (REMUALDO, 2004).

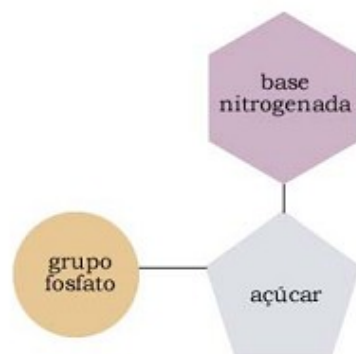


Figura 3: Esquema da estrutura de um nucleotídeo. Fonte: CHEMELLO,2007

Em função de suas propriedades químicas, essas bases se ligam através de pontes de hidrogênio, fazendo com que duas cadeias de DNA sejam ligadas transversalmente e unidas numa conformação denominada “Dupla Hélice”, onde estão dispostas de forma helicoidal (Figura 4) (CHEMELLO,2007).

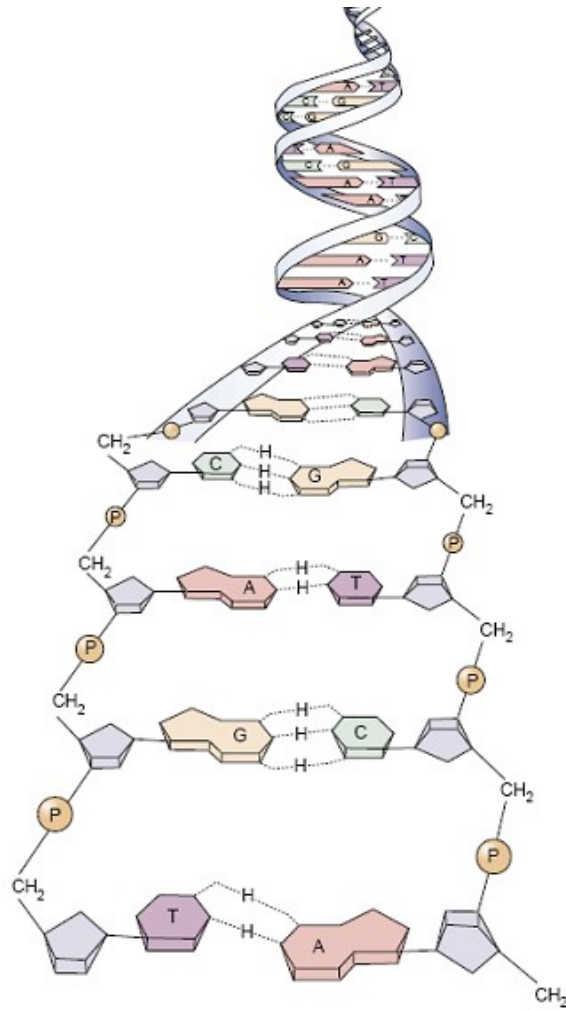


Figura 4: Dupla Hélice do DNA e seus componentes estruturais. Fonte: CHEMELLO, 2007

1.3 O DNA E A SÍNTESE PROTEICA

A duplicação do DNA ocorre através de um processo semiconservativo, sob a ação da DNA polimerase, uma enzima que quebra pontes de hidrogênio e, conseqüentemente ocorre separação das duas cadeias. Simultaneamente cada cadeia completa sua cadeia complementar através do encadeamento de novos nucleotídeos, resultando na formação de duas cadeias, que conservam, em sua estrutura, uma metade da molécula-mãe (REMUALDO, 2004).

A informação genética é armazenada na forma de seqüências de nucleotídeos que compõem o DNA, enquanto as funções celulares são realizadas pelas proteínas. A síntese de proteínas é comandada pelo RNA. Levando em consideração que este é sintetizado pelo DNA, pode-se fazer uma ponte indireta entre o DNA e as proteínas. O DNA é encontrado no núcleo e as proteínas sintetizadas no citoplasma, portanto o RNA cumpre o papel de um agente intermediário. O DNA contém um código molecular transcrito para o RNA, e este, por

meio de um processo de tradução reconhece os aminoácidos, que compõem as proteínas (Figura 5) (MUSSE, 2007).

Cada conjunto de três bases nitrogenadas forma um códon, unidade responsável por codificar cada um dos vinte aminoácidos existentes, que permitirão toda a construção e funcionamento do organismo humano (PARADELA et al, 2008).

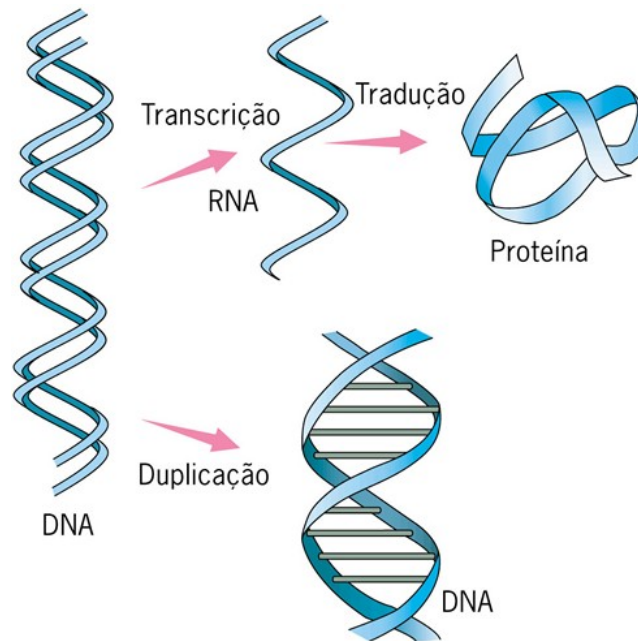


Figura 5: Processos de duplicação, tradução e transcrição e seus produtos. Adaptado de <http://www.turmadomario.com.br/cms/images/stories/DNA.jpg>. Acesso em 24 Ago. 2009.

1.4 TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA

O DNA se arranja em uma estrutura denominada cromossomo (Figura 6), seqüências lineares de genes. Estes genes são as unidades fundamentais responsáveis pela hereditariedade, que através de instruções químicas dadas às células do corpo, determinarão características de um indivíduo, desde a cor dos olhos até a predisposição a doenças (PARADELA et al, 2008).

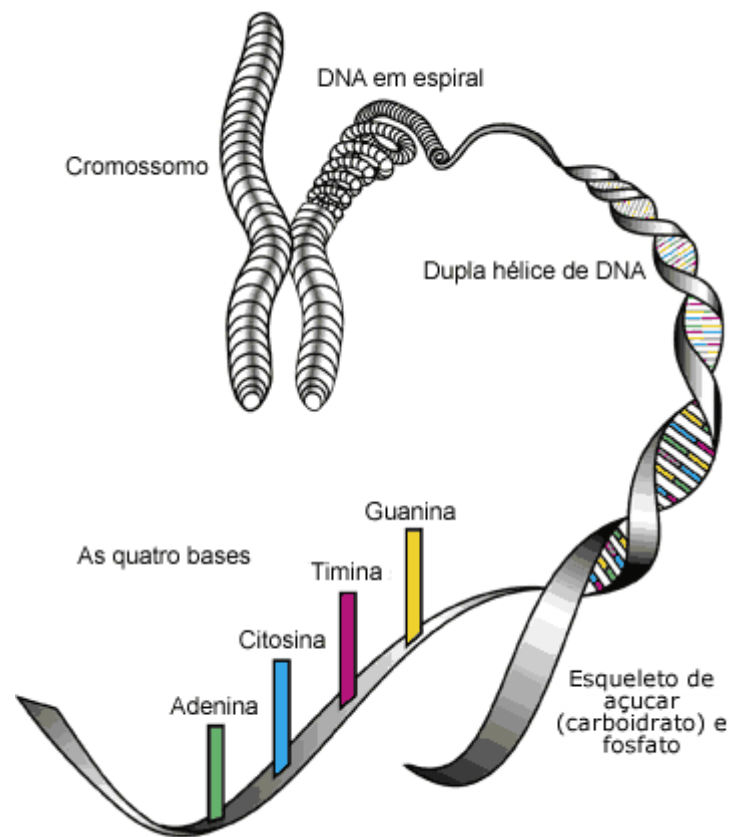


Figura 6: Representação de um cromossomo. Fonte: <http://static.hsw.com.br/gif/designer-children-basics.gif>. Acesso em 24 Jun. 2009.

Os cromossomos ocorrem aos pares nas células somáticas, células diplóides que possuem $2n$ cromossomos. Os cromossomos integrantes de cada par são chamados de homólogos. Cada espécie tem um número constante de cromossomos, no caso da espécie humana, as células somáticas apresentam 46 cromossomos ou 23 pares de cromossomos homólogos ($2n=46$), sendo destes pares 22 autossômicos e um par de cromossomos do sexo (X e Y) (Figura 7) (REMUALDO, 2004).

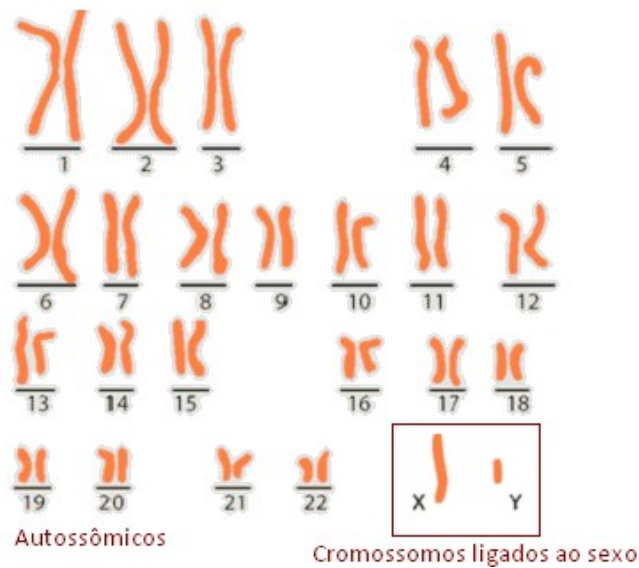


Figura 7: Cromossomos humanos aos pares segundo classificação convencional. Adaptado de CHAMELLO,2007

Em cada cromossomo existe um local denominado *locus*¹ gênico, onde cada alelo² ocupa um lugar definido. A diferença ou semelhança entre estes define o caráter genético do indivíduo. A presença de genes idênticos indica que o indivíduo é homocigoto, e quando o par em questão é composto por diferentes alelos, a denominação utilizada é heterocigoto (PARADELA et al, 2008).

1.5 O DNA COMO FERRAMENTA DE IDENTIFICAÇÃO

Devido ao seu alto poder discriminatório, o DNA é utilizado como ferramenta para identificação de indivíduos. Porém, os registros relatam que apenas em 1985 iniciaram as investigações policiais com base na identificação utilizando esta molécula, quando em um pequeno condado da Inglaterra uma mulher foi estuprada e assassinada. Então, um geneticista, chamado Alec Jeffreys, colheu o esperma encontrado na vítima e fez o exame de DNA. Tempos depois ocorreu um crime similar, e novamente Jeffreys analisou o sêmen encontrado na vítima, findando que pertencia ao mesmo homem que cometera o primeiro crime. As autoridades locais forjaram uma campanha de doação de sangue cuja finalidade era identificar o agressor, mas após todos os habitantes locais doarem sangue concluiu-se que nenhum deles possuía DNA igual ao do estuproador. A polícia prosseguiu com as investigações, e descobriu um viajante no condado. Quando este retornou, foi convidado a doar sangue, e após feito o

¹ Localização física específica de um gene em um cromossomo.

² Forma alternativa de um gene ou uma parte do DNA localizado em uma determinada região genética (*locus*).

teste de DNA, Jeffreys concluiu que o código genético do viajante era compatível com o do estuprador, sendo então condenado (DOLINSKY et al, 2007).

Várias mudanças ocorreram desde 1865, quando Gregor Johan Mendel demonstrou as leis da herança genética com base em simples ervilhas. Após James Watson e Francis Crick desvendarem a estrutura molecular do DNA em 1953, foi a vez de Alec Jeffreys dar sua contribuição. Ele introduziu a metodologia laboratorial para a tipagem de DNA em amostras humanas, que passou a ser aplicada tanto nos campos clínico e forense, como nos testes de paternidade e na investigação de crimes em geral. Essa metodologia implantada por Jeffreys é denominada RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição), e consta na caracterização de regiões hipervariáveis do genoma humano que ocorrem ao longo dos fragmentos de DNA gerados por uma enzima específica, no caso a endonuclease. É uma técnica eficiente, porém complexa e aplicável apenas para amostras recentes e quantitativamente expressivas (ZAHA et al, 2003).

Entretanto, em 1985, Kary Bank Mullis foi responsável por desenvolver uma tecnologia revolucionária e simples, a reação em cadeia da polimerase, universalmente conhecida como PCR (do termo em inglês *Polimerase Chain Reaction*- Reação de Polimerização em Cadeia). Esta técnica tornou viável ampliar com rapidez e precisão as moléculas de DNA em estudo, mesmo quando estas se encontram em quantidades mínimas e até mesmo deterioradas, como, geralmente, são encontradas as amostras coletadas em locais de ocorrência de crimes (ZAHA et al, 2003).

No mesmo ano, Alex Jeffreys e Cols desenvolveram outra técnica de extrema importância. Esta, conhecida como “Fingerprint” permite identificar marcadores genéticos sob a forma de repetidas seqüências de DNA, os chamados minissatélites, que são específicos em cada indivíduo (ZAHA, 2003).

Na última década houve progressos, desde a análise de impressões digitais do DNA com sondas multilocais e sondas unilocais, até as técnicas de amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O estudo dos antígenos HLA, anteriormente analisados por técnica sorologia, é hoje realizado por amplificação específica dos genes ou alelos HLA. Foram também desenvolvidos novos métodos de extração do DNA do sangue periférico, ossos, cabelos, manchas de sangue, material vaginal, entre outros (MORETI, 2009).

O exame é do tipo comparativo, porque são necessárias amostras coletadas da vítima ou do local do crime e do suspeito para que se possa proceder a investigação. Como a amostra servirá de base para um laudo, ou seja, será utilizada juridicamente como prova, é necessária

que a coleta seja feita de forma adequada e cautelosa, pois são vários os fatores que podem corromper a autenticidade do resultado, como erros na execução das técnicas e contaminação do material (QUEIROZ, 2008).

Antes os testes eram feitos por sorologia, ou seja, só eram realizados quando existiam amostras de sangue para fazer a comparação. A grande vantagem apresentada pelo DNA, é que para desenvolver testes, são necessárias quantidades ínfimas de qualquer tipo de material biológico, permitindo uma gama de possibilidades muito maior de resolução, além de que as amostras são muito mais resistentes a fatores ambientais (QUEIROZ, 2008).

Atualmente, as técnicas de identificação baseadas em DNA são utilizadas para fins criminais, na elucidação de vários crimes além de serem utilizados na identificação de corpos em acidentes de grande porte e no caso de reconhecimento de paternidade (QUEIROZ, 2008).

1.6 MARCADORES MOLECULARES

O genoma humano é constituído de 3 bilhões de bases, porém apenas 2% destas codificam proteínas. O restante cumpre, entre outras funções desconhecidas, função estrutural e reguladora. É nesta região do DNA que é encontrada a maior parte da multiplicidade genética entre indivíduos, já que as mutações – alterações na seqüência do DNA ocasionadas pela substituição de nucleotídeos – não estão submetidas a uma pressão seletiva tão intensa como a que ocorre no DNA codificante (MORETI, 2009).

Há uma exuberante variabilidade humana em termos de DNA. Dois genomas humanos, escolhidos aleatoriamente, diferem em aproximadamente um a cada 500 nucleotídeos, portanto, em virtude do amplo tamanho do genoma humano, isso implica em seis milhões de diferenças (MORETI, 2009).

A abundância de variações é tal, que a simples amostragem de um determinado número de regiões variáveis do DNA permite caracterizar confiavelmente a individualidade humana. Nos testes de determinação de identidade genética são analisadas regiões genômicas em que há variação entre pessoas sadias. Tais regiões são denominadas marcadores moleculares (ANDRADE et al, 2008).

Os marcadores moleculares são utilizados para caracterizar o DNA de um indivíduo em um padrão ou perfil de fragmentos que lhe é peculiar. Neste caso são utilizados marcadores polimórficos, cujos alelos são definidos como variações na seqüência genética presentes na população com freqüência superior ou igual a 1% (MORETI, 2009).

Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas técnicas para estudo de diferentes tipos de polimorfismos de DNA, fornecendo aos cientistas uma ampliada gama de métodos para resolução de problemas envolvendo tais seqüências (PENA, 2005).

A variação se dá de duas formas principais, uma variabilidade correlativa ao tamanho de fragmentos repetidos em *tandem* (em seqüência), que perfaz quase metade da constituição do DNA não codificante, constituída por determinada seqüência que se repete uma ao lado da outra, diversas vezes. Dependendo do tamanho da unidade de repetição, estas seqüências podem ser denominadas minissatélites e microsatélites (MORETI, 2009).

VNTRs (do inglês *Variable Number of Tandem Repeats* – número variável de repetições em *tandem*), também denominados “minissatélites”, são polimorfismos de DNA que consistem numa série de comprimento de repetições de fragmentos de DNA. Uma região VNTR alegórica consiste de 500 a 1000 pares de base (pb) e compreende principalmente unidades com seqüências repetidas de 15 a 35 pb de comprimento. Os *locis* VNTR são particularmente convenientes como marcadores na área da identificação humana, pois possuem um número altíssimo de alelos diferentes, tornando praticamente nula a possibilidade de existência de dois indivíduos que compartilhem o mesmo genótipo (ANDRADE et al, 2008).

STRs (do inglês *short tandem repeats* – repetições curtas em *tandem*), ou microsatélites são polimorfismos muito similares aos VNTRs, porém diferindo em tamanho (em geral não ultrapassam 200 pb) e no comprimento das unidades de repetição, que variam entre 2 e 7 nucleotídeos. Esses locos são muito abundantes no genoma humano, e cada um deles possui grande número de diferentes alelos, inclusive mais que o encontrado em VNTRs, o que os torna ainda mais útil para identificação humana (ANDRADE et al, 2008).

Além da variabilidade de tamanho, ocorre também a variabilidade de seqüência, sendo esta a forma mais freqüente de variação, onde ocorre a substituição de um único nucleotídeo por outro, denominado polimorfismo de nucleotídeo único ou SNP (do inglês *single nucleotide polymorphisms*). Outro grande grupo de polimorfismos encontrado no genoma humano são os de inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos (polimorfismos de inserção – deleção; ins/del) (MORETI, 2009; ANDRADE et al, 2008).

Ambos apresentam a grande vantagem da possibilidade de ser estudado em produtos de amplificação muito curtos (50 pb ou menos), apresentando portanto, distintas vantagens sobre os microsatélites no estudo de DNA extremamente degradado (PENA, 2005).

Na área da identificação humana, estes marcadores apresentam desvantagem de possuir apenas dois alelos, dando margem para uma maior possibilidade de dois indivíduos

compartilharem o mesmo genótipo, mesmo sem serem aparentados ou relacionados com a cena do crime. Uma alternativa para contornar tal complicação é a tipagem de um número maior de marcadores ins/del, visando obter uma identificação realmente precisa (ANDRADE et al, 2008).

1.7 DNA MITOCONDRIAL NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Mitocôndrias são corpúsculos que possuem forma esférica ou em forma de bastonete, relacionados com a respiração celular, que aparecem imersos no citoplasma. São encontradas em todas as células de organismos eucariontes aeróbios, e a quantidade desta organela por célula varia conforme a necessidade energética (REMUALDO,2004).

Embora a grande maioria dos genes se encontre no núcleo, um pequeno subgrupo reside no citoplasma, especificamente nas mitocôndrias. Tais genes mitocondriais exibem herança exclusivamente materna. Todas as células humanas possuem centenas de mitocôndrias, e cada uma delas contém várias cópias de uma molécula circular, denominada cromossomo mitocondrial (Figura 8) (ANDRADE et al, 2008).

A grande vantagem que o DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta em relação ao DNA nuclear é a quantidade de cópias, pois mesmo possuindo um excelente poder discriminatório, este aparece com uma frequência de apenas duas cópias por célula diplóide, enquanto o DNA mitocondrial pode apresentar até 5000 cópias. Por esse contexto, o mtDNA é um marcador de grande utilidade para investigações criminais, uma vez que esta abundância oferece uma maior chance de algumas cópias suportarem a degradação das amostras obtidas para a análise forense (DOLINSKY et al, 2007).

O DNA extranuclear tem como característica importante o fato de ser herdado uniparentalmente, pois apenas as mitocôndrias do gameta materno estão presentes no embrião e conseqüentemente no adulto, portanto as relações familiares pela linhagem materna são facilmente reconhecidas (ANDRADE et al, 2008).

Os alvos do seqüenciamento do DNAm_t são suas regiões específicas do cromossomo, denominadas de regiões hipervariáveis I e II (HV1/HV2), e a taxa de mutação em tais regiões varia de cinco a dez vezes mais quando comparadas ao DNA nuclear. Quando almeja-se enquadrar o suspeito em algum grupo étnico. É feita a análise dos polimorfismos encontrados em HV1 e HV2 para então compará-los com outros de linhagem materna ou provindos de um banco de dados biológico, evolucionário ou antropológico da população, uma vez que cada

população de origem distinta possui um conjunto específico de SNPs (ANDRADE et al, 2008).

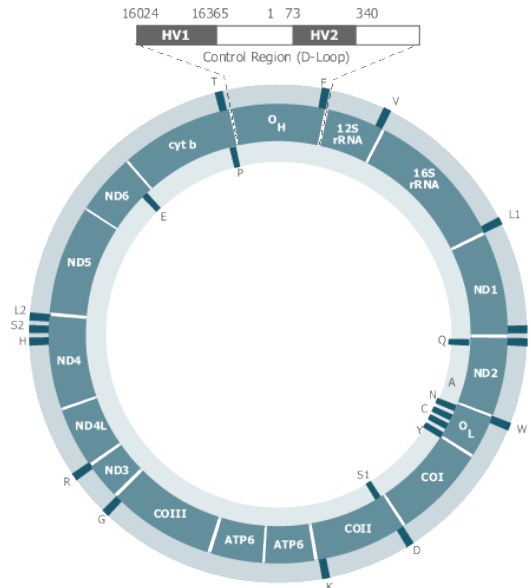


Figura 8: Representação do mtDNA. Fonte: http://www.nfstc.org/pdi/Subject09/pdi_s09_m01_01_b.htm. Acesso em 27 Out. 2009.

Deve-se considerar que a tipagem de DNA mitocondrial só apresentará um resultado correto e definitivo se a variação do DNA do indivíduo analisado for concordante com a de seus parentes maternos, pois devido a alta taxa de mutação, uma diferença de seqüência não significa que os indivíduos comparados estejam necessariamente relacionados (ANDRADE et al, 2008).

A técnica é aplicada em casos onde a amostra tenha uma quantidade insuficiente ou até mesmo nula de DNA nuclear, como é o caso de pêlos ou fios de cabelo sem bulbo, ou em grandes desastres, como incêndios ou acidentes aéreos, onde os corpos apresentam grande dificuldade para a identificação, sendo necessária a análise e comparação do DNAmT com seqüências obtidas de possíveis irmãos ou ascendentes maternos (DOLINSKY et al, 2007).

1.8 CROMOSSOMO Y NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

O cromossomo Y presente no DNA nuclear, encontra-se com uma freqüência de apenas uma cópia por célula e é transmitido para todos os descendentes masculinos. Assim como a análise do mtDNA é utilizada em questões relacionadas à linhagem materna, a análise de STRs do cromossomo Y fornece importantes informações a respeito da origem parental paterna (ANDRADE et al, 2008).

Investigações acerca de STRs do cromossomo Y são utilizadas para elucidar casos de estupro onde são encontradas misturas de secreção vaginal com sêmen, além de testes de paternidade de filhos do sexo masculino ou onde a mãe é desconhecida, uma vez que o cromossomo em questão é característica única de linhagem paterna (DOLINKSKY et al, 2007).

2OBJETIVO

O presente trabalho busca entender o funcionamento dos principais métodos de identificação humana através do DNA, considerando sua importância para a ciência forense e a criminalística, apontando o funcionamento das principais técnicas utilizadas e os impactos de seus resultados sobre casos jurídicos.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM

3.1.1 Aspectos Jurídicos

O número de tribunais que têm aceitado evidências baseadas no DNA cresce gradativamente, e a capacidade de introduzir achados de material genético como prova concreta sofre um grande impacto pela coleta das provas e métodos de preservação (ANDRADE et al, 2008).

As amostras de material biológico devem ser minuciosamente colhidas, seja quando dispostas na cena do crime ou coletadas diretamente de indivíduos devidamente identificados. A coleta deve ser realizada por profissionais que possuam treinamento e práticas de manipulação em laboratórios forenses e conhecimentos específicos baseados na literatura especializada (INTERPOL, 2001).

O DNA pode ser coletado da maioria dos espécimes biológicos, pois sendo uma molécula estável em ambiente seco e frio, se armazenado em tais condições, pode gerar resultados confiáveis (ANDRADE et al, 2008).

A degradação de amostras pode ocorrer devido a um processo natural de exposição ao meio-ambiente. Fatores naturais como luz, umidade, temperaturas elevadas e contaminações bacterianas ou fúngicas levam a degradação química da molécula, podendo acarretar quebras e alterações da cadeia de nucleotídeos e, como consequência, modificar a composição e a estrutura normal do DNA, impossibilitando a análise ou conduzindo a conclusões errôneas (ANDRADE et al, 2008).

Visando o estabelecimento de normas para a coleta e exame de materiais biológicos para a identificação humana, a Secretaria de Segurança Pública do Estado de São Paulo (SSP/SP) baixou a resolução SSP-194, em 2 de junho de 1999:

“Considerando:

- a) a necessidade de normatizar os serviços periciais relativos à coleta de materiais biológicos para exames de identificação humana, tanto nos locais de crime quanto na pessoa humana, viva ou morta;*
- b) que os procedimentos a serem seguidos pelos órgãos policiais e periciais oficiais devem estar em consonância com os ditames da legislação em vigor, e*

c) que é imprescindível a correta preservação das amostras para não haver contaminações ou outros prejuízos ”

O anexo da mesma resolução cita cuidados necessários que devem ser obrigatoriamente tomados para a realização da coleta, armazenamento e análise do material biológico para extração de DNA. São eles:

I. Durante qualquer coleta de material biológico é imprescindível a utilização de luvas descartáveis, para que se evite contaminação exógena.

II. Todos os instrumentos e materiais utilizados na colheita deverão ser estéreis.

III. Deverão ser evitadas coletas de amostras contaminadas por terra, vegetais e outros elementos orgânicos.

IV. Cada vestígio eleito para coleta deverá ser fotografado, ter sua origem descrita em relatório individual de identificação, indicando a data e a natureza da ocorrência; o local, a forma e as condições da coleta; o horário em que foi coletado, consignando-se, quando possível, o tempo aproximado após o crime; bem como a forma utilizada para acondicionamento e preservação.

V. Qualquer material que se destine à análise forense de DNA deverá, desde sua coleta até seu encaminhamento final, ser acondicionado isoladamente e devidamente identificado, através de relatório preceituado no item anterior.

VI. Todo material úmido coletado deverá permanecer em embalagem plástica pelo tempo máximo de duas horas.

VII. Para que se evite a degradação e a contaminação por microrganismos, o material a ser analisado, quando úmido, deverá ser necessariamente seco antes de seu acondicionamento final.

3.1.2 Matrizes Biológicas

As principais amostras coletadas para análise biológica de identificação são fluídos líquidos ou secos (sangue, espermatozoides, saliva, urina e outros), tecidos, órgãos dentes e ossos, além de pêlos e cabelos (SSP/SP, 1999).

Dentre estes, o sangue é o mais freqüentemente encontrado em cenas de crime, seja em seu estado líquido ou em manchas secas. Pode-se encontrar sangue em suportes porosos e absorventes, como sofás, tapetes, alcatifas e mesmo na roupa da vítima ou do autor do delito; ou em suportes não porosos, tais como diferentes tipos de revestimentos de chão, paredes, vidros e cerâmicas (PINHEIRO, 2004).

O sêmen é a seguir o vestígio mais analisado, devido à grande incidência de casos de suspeita de agressão sexual. Na maioria dos casos a amostra para exame é o exsudato vaginal da vítima, colhido por profissionais. No entanto, também pode haver resquícios de material biológico em peças do vestuário da vítima ou do agressor, ou ainda no local onde ocorreu a violação, tanto em suportes porosos como não porosos (PINHEIRO, 2004).

A possibilidade de mistura das amostras de sêmen com outros tipos de produtos biológicos não constitui problema para resolução dos casos, pois existem metodologias que permitem a separação eficiente do DNA dos espermatozoides do DNA das células do epitélio vaginal, e no caso de mistura com amostras de sêmen de outro indivíduo, a análise do material genético possibilita a detecção e identificação de ambos (PINHEIRO, 2004).

Pêlos também são constantemente encontrados, geralmente em peças de vestuário, nas mãos da vítima, ou ainda na cena do crime, e devem ser recolhidos com precaução, pois podem ser provenientes de pessoas distintas. Amostras que contenham saliva, como filtros de cigarros fumados, garrafas ou latas, objetos mordidos e até mesmo selos ou envelopes são susceptíveis de análise, mas as mais frequentes são pontas de cigarros que, não raramente, aparecem no local do crime (PINHEIRO, 2004).

A identificação de restos cadavéricos através de material genético depende do estado de preservação do corpo, que varia do tempo decorrido desde a morte e outros fatores ambientais, principalmente a umidade e a temperatura. Se os restos estiverem submersos a possibilidade de conseguir bons resultados é remota, afinal o estado de degradação é bem maior. Como geralmente não dispõe-se de sangue, o material analisado são fragmentos de fígado, músculos, tufo de fios de cabelo com bulbos ou ossos, e em caso de grandes catástrofes com elevado número de mortes, como incêndios e quedas de avião, onde as vítimas geralmente morrem respectivamente carbonizadas e afogadas, a polpa dentária é o principal elemento da análise, pois é a parte do organismo mais preservada. Quando a morte ocorreu a mais de 5 anos, os tecidos moles já desapareceram e os dentes e cabelos, se ainda existirem, possuem quantidades exíguas e degradadas de DNA, restando apenas os ossos como fonte de material disponível (PINHEIRO, 2004).

O material fetal é usado para esclarecimento de casos de investigação biológica de maternidade onde exista a suspeita de abandono pela progenitora ou quando a gravidez for resultado de violação com precedente interrupção. As amostras procedentes do tecido fetal contêm apreciável quantidade de DNA, susceptível de análise (PINHEIRO, 2004).

3.1.3 Coleta e Armazenamento

Fluídos líquidos devem ser colhidos através de dispositivos próprios para coleta deste tipo de material, composto por uma haste longa e flexível com ponta de algodão (denominados *swab*) ou gaze. Após secos em temperatura ambiente e local ventilado, são acondicionados isoladamente em envelope de papel escuro ou na própria embalagem do *swab*, e armazenados em congeladores a -20°C. No caso de amostras de urina e semelhantes, a coleta é feita utilizando seringa ou pipeta plástica e transferida para frasco próprio (SSP/SP, 1999).

Vestes ou objetos que contenham fluídos líquidos e estejam umedecidos por estes, devem ser secos em temperatura ambiente, em local ventilado e ausente de luz solar, e então acondicionados em envelope de papel escuro ou caixa de papelão própria e armazenados sob refrigeração (SSP/SP, 1999).

O procedimento utilizado para fluídos secos é mais simples. Os vestígios encontrados são mandados em sua totalidade para análise, porém em casos onde estes se encontram em grandes objetos ou superfícies não absorventes, a mancha de material biológico deve ser retirada com o auxílio de uma lâmina de bisturi ou espátula própria para raspagem, ou ainda, com o uso de *swab* umedecido em água destilada estéril. Independente do método utilizado para coleta, toda amostra tem que ser acondicionada isoladamente em envelope de papel escuro ou caixa de papelão própria e armazenado sob refrigeração (SSP/SP, 1999).

Tecidos, órgãos, dentes e ossos são retirados em sua totalidade ou em fragmentos, com auxílio de pinças para evitar a mistura de materiais e embalados isoladamente em frasco próprio ou envelope de papel, de acordo com o tipo de material e então armazenados a -20°C. É absolutamente proibida a limpeza de ossos ou dentes com água oxigenada ou substâncias cáusticas ou clarificantes, pois comprometem a preservação do material biológico (SSP/SP, 1999).

Amostras individuais ou em tufo de pêlos e cabelos com bulbo, se misturadas com fluídos corpóreos devem ser separados dos componentes da mistura que os contêm. As desprovidas de raízes são evitadas, pois dependem da extração diferenciada de DNA mitocondrial. Amostras úmidas são secas a temperatura ambiente e cada grupo de material e armazenadas separadamente em envelope de papel escuro e acondicionado sob refrigeração (SSP/SP, 1999).

Amostras *post-mortem*, provindas de indivíduos mortos, são sempre coletadas em duplicata. Nos crimes sexuais, além da coleta de sangue para a identificação da vítima, são

colhidas, com ajuda de um *swab*, amostras da vagina, ânus, boca e possíveis vestígios contidos sob as unhas. Sêmem contido na face ou em outras áreas do corpo, também pode ser removido com *swab* umedecido em água destilada estéril. Em tais casos, uma área adjacente livre de sêmem também é esfregada para a obtenção de um controle. Após a secagem em temperatura ambiente, cada *swab* é isoladamente acondicionado em sua própria embalagem e armazenado sob refrigeração (SSP/SP, 1999).

Quando existentes, amostras sanguíneas colhidas *post-mortem* estão sujeitas a problemas de contaminação e degradação, portanto, a retirada de material é feita por punção cardíaca ou diretamente da cavidade cardíaca ou vasos de grosso calibre (SSP/SP, 1999).

De cadáveres em decomposição ou decompostos, as amostras são colhidas isoladamente, preservadas e condicionadas conforme o tipo de material. Em caso de material fetal, estas devem ser rapidamente congeladas, para evitar sua degradação. É importante que não se adicione nenhum tipo de conservante, como formol ou álcool, pois estes alteram de forma irreversível os componentes celulares (PINHEIRO,2004).

Uma vez coletadas, as amostras são imediatamente encaminhadas para o laboratório forense. Em casos de justiça, se a evidência não for devidamente documentada, coletada, embalada e preservada cautelosamente, corre o risco de não preencher os requisitos legais e científicos para serem admitidos frente a um tribunal, pois, se ela não foi apropriadamente documentada antes da coleta, sua origem pode ser questionada e caso tenha sido mal coletada ou embalada, a possibilidade de contaminação aumentará, levando a uma maior possibilidade de discordância dos resultados da análise do DNA. Por conseguinte, uma confiabilidade nos resultados dos métodos aplicados só é conseguida se as medidas estritas de cuidados com contaminação forem seguidas (ANDRADE et al, 2008).

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A quantidade, a pureza e a integridade do DNA dependem de vários fatores, que podem ser influenciados pelas metodologias aplicadas para sua extração. Após a coleta do material biológico, o DNA da amostra é extraído. Proteínas celulares, contaminações químicas e microbiológicas diminuem o poder discriminatório das análises utilizando o DNA (MORETI, 2009).

Há uma gama de material biológico humano de onde é possível extrair o DNA para análise forense, de relevância para subsidiar a investigação de crimes, observando que a qualidade das amostras é de fundamental importância (MORETI,2009).

Do sangue, o DNA é extraído dos leucócitos, visto que os eritrócitos são células anucleadas. Nas amostras de sêmen, o material genético provém dos espermatozóides, por isso, é conveniente efetuar em primeiro lugar, uma confirmação microscópica de sua existência na amostra a estudar. O DNA dos pêlos está particularmente concentrado na raiz, e a quantidade deste varia de pessoa para pessoa e até mesmo na mesma pessoa, conforme o local de proveniência da amostra. A saliva e a urina não são constituídas por células, mas como contém células epiteliais, respectivamente da cavidade bucal e das vias urinárias, possuem DNA (PINHEIRO,2004).

A escolha do uso de diferentes métodos de extração de material genético está relacionada ao tipo de material em questão e influencia diretamente o sucesso da análise. A grande maioria dos procedimentos de extração do DNA compreende a lise celular, seguida da remoção de proteínas celulares precipitadas, que podem interferir na análise, e por fim a precipitação do DNA com sua final eluição (MORETI, 2009).

Existem diversos métodos para a obtenção de DNA, nos casos forenses os mais utilizados são a extração orgânica e seu leque de variações, e a precipitação em álcool. A extração orgânica é a mais tradicional, onde a proteinase K é responsável pela lise celular e o fenol clorofórmio para a precipitação das proteínas (MORETI, 2009).

A técnica mais amplamente empregada envolve, em sua primeira fase a lise celular, onde ocorre a liberação de componentes celulares num tampão de lise da membrana (composto por Tris-HCl, sais e EDTA) juntamente com detergentes. As enzimas presentes no detergente desestruturam as bicamadas lipídicas que compõem as membranas celulares. O tampão, como possui pH entre 8 e 9, desfavorece a ação de nucleases³, e os sais componentes deste, ajudam a manter as proteínas dissolvidas no líquido extraído, impedindo que elas precipitem junto com o DNA. Além disso, uma digestão através de uma protease, a proteinase-K, durante algumas horas sob temperaturas moderadas (entre 40 e 60°C) desnatura as proteínas que protegem as moléculas do DNA ao longo do cromossomo (MORETI, 2009).

A remoção dos resíduos celulares e a precipitação as proteínas é a principal etapa no processo de extração. O método mais utilizado para a desproteinização é realizado através de um tratamento com fenol e clorofórmio. Tais solventes orgânicos desnaturam proteínas e enzimas, e após a centrifugação são separados, permanecendo na interface entre a fase aquosa (superior) que contém os ácidos nucléicos e a fase orgânica (inferior). Como grupos hidrofóbicos podem romper interações intramoleculares estabilizantes da estrutura da proteína, um elevado volume de solvente orgânico é utilizado para reduzir a concentração

³ Enzimas capazes de quebrar ligações entre nucleotídeos

efetiva da água, deixando menos moléculas de água para hidratação da proteína (MORETI, 2009).

Existem várias alternativas ao método orgânico descrito na literatura forense. Um deles envolve a enzima Chelex, cujo processo de extração se dá levando a amostra a 100°C, seguido do resgate do DNA do sobrenadante. A resina age quelando grupos com íons metálicos polivalentes, como o magnésio, que é um cofator para nucleases, e a remoção inativa catalisadores na quebra de DNA, prevenindo a degradação deste em presença de íons metálicos a altas temperaturas e em condições de baixa força iônica (MORETI, 2009).

A recuperação dos ácidos nucléicos totais por precipitação em álcool (etanol, isopropanol, butanol) só ocorre mediante a existência de cátions suficientes para neutralizar as cargas repulsoras que foram geradas entre as cadeias polinucleotídicas. Alcoóis desidratam a molécula de DNA que expõe as cargas negativas de seus grupos fosfatos, e na presença de sais, os íons com carga positiva do sal são atraídos pelas cargas negativas do DNA, neutralizando a carga elétrica e fazendo com que ao invés de se repelirem, as moléculas de DNA se juntem. A adição do álcool em baixas temperaturas precipita o DNA, uma vez que este é insolúvel em concentrações elevadas de sal e álcool. Enquanto as demais substâncias celulares permanecem dissolvidas na solução, o DNA precipita na camada alcoólica (MORETI, 2009).

3.3 TÉCNICAS

3.3.1 RFLP

Por RFLP entende-se, em tradução livre do termo, polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA. Tal polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com seqüências homólogas do material genético marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam reações de luminescência (ANTONINI et al, 2004).

Para detecção do polimorfismo é necessário que as seqüências de nucleotídeos nas fitas de DNA dos indivíduos comparados sejam distintas. Como estas são potencialmente enormes, sua detecção abre perspectivas relevantes ao estudo do genoma (ANTONINI et al, 2004).

A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pares de base, reconhecidas e clivadas por enzimas de restrição, pode variar entre indivíduos geneticamente diferentes,

gerando então os polimorfismos que são observados na técnica. Inserções, deleções e outros tipos de rearranjos na molécula, como translocações e inversões, também resultam em diferenças na seqüência de DNA (ANTONINI et al, 2004).

A técnica propende detectar diferenças na seqüência de DNA dos indivíduos analisados. Visando seqüenciar o material genético de ambos, o DNA extraído dos núcleos dos glóbulos brancos é tratado com enzimas de restrição, que o corta em determinado número de pontos (sítios de restrição), gerando grandes quantidades de fragmentos, que variam da ordem de 10^4 a 10^7 dependendo do tamanho do genoma. A diferença apresentada na seqüência de nucleotídeos resulta na clivagem de fragmentos de tamanhos distintos, separados através de um processo de eletroforese em gel de agarose (ANTONINI et al, 2004).

A eletroforese é um processo que transfere as moléculas com carga negativa para o pólo positivo do gel através da eletricidade e vice-versa (Figura 9). A mobilidade de moléculas no campo elétrico aplicado depende de seu tamanho, forma e carga elétrica. O meio formado por gel do polissacarídeo agarose, conhecido como ágar-ágar, permite a passagem dos fragmentos clivados pelas endonucleases. Os segmentos curtos se movem para mais longe de sua localização original e os mais longos ficam mais perto, mas ambos se alinham em fileiras paralelas, formando um padrão (CHEMELLO, 2007).

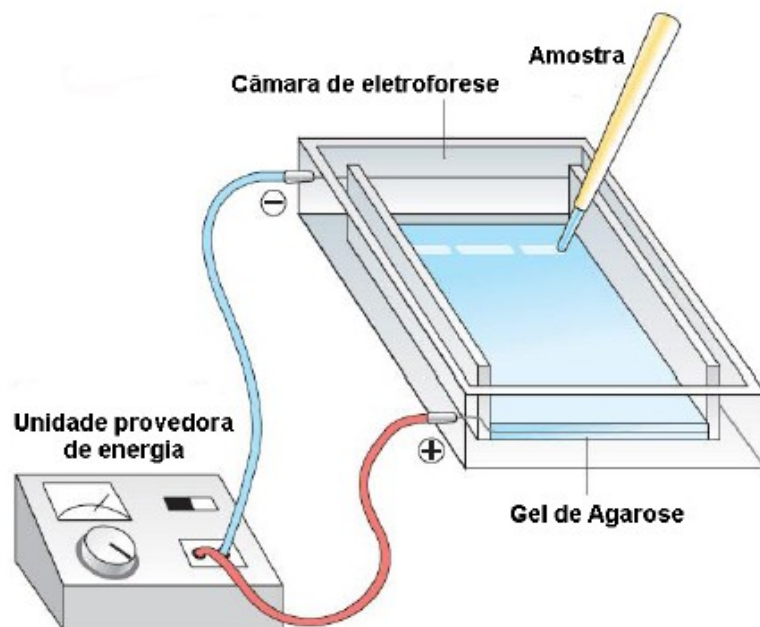


Ilustração 9: Técnica de separação por eletroforese. Fonte: CHEMELLO,2007.

Porém, a disparidade do tamanho dos fragmentos obtidos não é plausível de visualização direta no gel, uma vez que estes separados através da eletrólise produzem um efeito de arraste contínuo (CHEMELLO, 2007).

Para efetuar a detecção dos marcadores RFLP, os fragmentos separados no gel de agarose são transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose por capilaridade ou vácuo, através de *Southern Blot*⁴. A membrana é revestida de forma que as faixas de DNA de diferentes comprimentos fiquem visíveis a olho nu, e esta, como é colocada diretamente sobre o gel, permite que a ordem dos fragmentos marcados por eletroforese não se altere durante a transferência (FREEMAN, 2008).

Os fragmentos são então fixados covalentemente através de alta temperatura em forno a vácuo ou luz ultravioleta, o que permite reutilizações da membrana e conseqüentemente diminuição no custo da técnica. A visualização de fragmentos polimórficos por entre os inúmeros fragmentos resultantes da clivagem também transferidos é realizada através da hibridização de pequenos fragmentos clonados de DNA denominados sondas. Para a preparação das sondas incorporam-se nucleotídeos contendo moléculas de fósforo radioativo ou nucleotídeos modificados nos fragmentos clonados do material genético. Estas apresentam seqüências homólogas, mas não necessariamente conhecidas do DNA imobilizado na membrana. Elas são fundamentais, pois permitem apenas a visualização dos fragmentos fixados na membrana que são homólogos ao DNA da membrana (ANTONINI et al, 2004).

Após a hibridização, a membrana é exposta a um filme de raio-x num processo denominado autoradiografia, que revela bandas que constituem os marcadores RFLP. As bandas são resultado da sensibilização do filme pela emissão de partículas provenientes do fósforo radioativo ou fótons de luz. Se os indivíduos diferem entre si em relação à posição do sítio de restrição enzimática na fita de DNA, os fragmentos gerados serão de diferentes tamanhos e a banda será visualizada em posições diferentes na autoradiografia. Porém se for constatada semelhança entre as bandas, conclui-se que representam um marcador RFLP e portanto podem ser utilizadas como marcadores genéticos (ANTONINI et al, 2004).

A autoradiografia é uma imagem em raio-x deixada pelo padrão de decaimento da radiação. Suas características, as faixas paralelas apresentadas caracterizam um perfil de DNA, que pode identificar de forma precisa um indivíduo, pois os sítios de restrição de uma pessoa funcionam tal como uma impressão digital (Figura 10) (ROCHA et al, 2006).

⁴ Método da biologia molecular utilizado para verificar se uma determinada seqüência de DNA está ou não presente em uma amostra de DNA analisada. Isso é feito por meio do realce do resultado de uma eletroforese em gel de agarose.

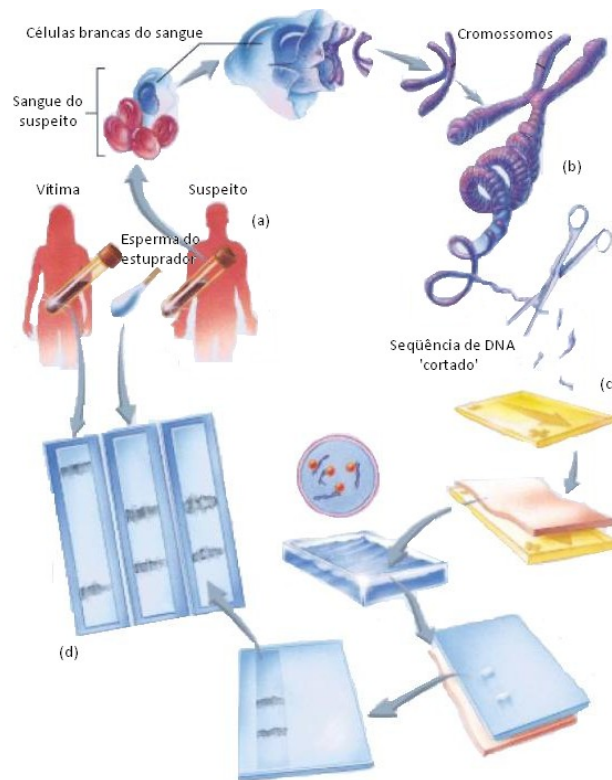


Figura 10: Esquema do teste de RFLP para fins forenses. Adaptado de CHEMELLO,2007

3.3.2 PCR

O estopim para o desenvolvimento da biologia molecular foi a descoberta de Watson e Crick, cientistas que revolucionaram a ciência com suas descobertas acerca do DNA. Porém não bastava apenas o conhecimento de sua existência, era necessária a manipulação da molécula (ZAHA et al, 2003).

Partindo do princípio que a informação genética encontra-se no DNA, pouco se sabia sobre as seqüências das bases contidas nas moléculas dos ácidos nucléicos, pois além de muito grandes, apresentavam variações de apenas quatro aminoácidos (ZAHA et al, 2003).

Em 1969, Kleppe apresenta um estudo feito sobre a utilização de DNA polimerase na amplificação de moléculas sintéticas de DNA. Posteriormente, Stuart Linn, então professor de Kary Mullis, usou a tese do cientista em suas aulas (ZAHA et al, 2003).

Os princípios de Kleppe foram bem aproveitados, afinal em 1983, Kary B. Mullis cria a técnica conhecida como PCR (*Polimerase Chain Reaction* - Reação de Polimerase em Cadeia). A técnica revolucionou as formas de investigação e diagnóstico médico, tornando possível a rápida produção de grandes quantidades de material genético e garantindo não só avanços significativos nas áreas de investigação genômica como também o Premio Nobel de Química para seu inventor, em 1993 (ZAHA et al, 2003).

A técnica qualitativa e semi-conservativa, e consiste num processo relativamente simples, onde moléculas de DNA ou cDNA são exponencialmente amplificadas de forma rápida, com o grande diferencial de ao invés de *in vivo*, ser realizada *in vitro*, permitindo elementos do processo natural da replicação de DNA e necessitando apenas de quantidades mínimas de amostras contendo o material genético molde, que sofrerá uma amplificação controlada por enzimas, obtendo-se milhões de cópias do fragmento de DNA de interesse. A seqüência base pode provir tanto de uma única célula ou cromossomo quanto de um DNA parcialmente degradado, como é o caso da grande maioria de amostras de origem forense (ZAHA et al, 2003).

A PCR possibilita a amplificação de curtos segmentos da molécula de DNA, contendo aproximadamente de cem a quinhentos pares de base. É necessário para uma reação de amplificação, além da seqüência-alvo do DNA, uma DNA polimerase termoestável, tampão de reação e concentração adequada de $MgCl_2$, dois oligonucleotídeos (primers) e desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs), os quatro nucleotídeos do DNA utilizados na reação para suportar os inúmeros ciclos de polimerização. Tais componentes são misturados e a amostra é posta num termociclador, aparelho que possibilitará o rápido aquecimento e resfriamento das amostras (ZAHA et al, 2003).

A técnica baseia-se no princípio natural de replicação do DNA, constando num processo dividido em três etapas, que em conjunto designam um ciclo que irá se repetir num número específico de vezes. As etapas se dividem em: desnaturação, hibridização ou anelamento e polimerização (Figura 11) (ZAHA et al, 2003).

Para que a amplificação seletiva seja realizada, alguma informação prévia a respeito das sequencias-alvo é necessária. A informação é utilizada para moldar dois oligonucleotídeos iniciadores, denominados primers, específicos para a seqüência de interesse, e apresentam cerca de 15 a 25 nucleotídeos de extensão (ZAHA et al, 2003).

Algumas condições básicas devem ser cumpridas para que não ocorram complicações durante o processo: corretas concentrações de magnésio, enzimas e primers e a temperatura adequada de hibridização, que deve ser definida para cada par de primers, tomando sempre uma postura cautelosa pra que não haja contaminações com DNAs que não os de interesse (ZAHA et al, 2003).

A ligação entre as cadeias de DNA que formam a fita se dá graças a ligações de hidrogênio. Devido as propriedades químicas da molécula, a desnaturação, primeira etapa da PCR, ocorre geralmente em temperaturas elevadas, em torno de 95°C, justamente para romper tais ligações de hidrogênio, separando a cadeia em duas fitas únicas, porém sem comprometer

as ligações entre as moléculas de fosfato e desoxirribose. Esse aumento da temperatura mimetiza a ação da enzima helicase na duplicação *in vivo* do DNA (ZAHA et al, 2003).

O anelamento é a segunda etapa, onde ocorre a ligação dos primers ao DNA. Após adicionados os primers, eles se ligam especificamente às seqüências de DNA complementares ao sítio alvo, delimitando a região de interesse a ser analisada. É utilizado um primer para cada cadeia simples produzida no processo de desnaturação. Procura-se hibridizar os primers com a seqüência alvo, onde o início, já marcado, se liga a seqüência complementar. A temperatura nesta etapa depende das características dos primers, variando conforme seu comprimento e seqüência, onde grandes quantidades de C e G exigem maiores temperaturas, que costumam variar de 45°C a 65°C. Essa escolha criteriosa de temperatura é fundamental, pois possibilita que as seqüências iniciadoras se liguem a seqüência alvo com alto grau de especificidade (ZAHA et al, 2003).

Por fim, ocorre a polimerização. Como a própria designação sugere, é a parte do processo onde há a polimerização da fita pela enzima DNA polimerase. Posteriormente a enzima Klenow era a utilizada, uma DNA polimerase I geneticamente modificada que visava a remoção da função exonuclease, porém ela não apresentava a praticidade necessária, já que a cada ciclo era desnaturada, obrigando renovar após cada ciclo sua quantidade. Para suprimir tal problema ela foi substituída pela Taq polimerase, uma polimerase oriunda da bactéria *Thermus aquaticus*, que por habitar em locais com altas temperaturas mostrava-se resistente às constantes variações de temperatura dos ciclos da PCR. A temperatura nesta etapa era 72°C, pois permitia a condição ideal para o uso de tal enzima (RUMJANECK,2001).

A síntese é iniciada numa zona onde se encontram cadeias duplas, incorporando os nucleotídeos complementares a seqüência alvo e utilizando os dNTPs em solução. A extensão dá-se início no extremo 3' do primer, criando uma cadeia dupla a partir de cada cadeia simples. A Taq polimerase sintetiza exclusivamente na direção 5' – 3' (ZAHA et al, 2003).

A repetição contínua das etapas permite a amplificação do DNA molde, e após o segundo ciclo já são obtidas quatro vezes mais cópias da amostra da seqüência desejada de DNA, e esse processo continua gradativamente, numa progressão de 2^n , onde n é o número de moléculas iniciais. Após cerca de 25 ciclos de síntese de DNA, os produtos da PCR irão incluir, além da sequencia-alvo inicial, cerca de 10^5 cópias desta, quantidade facilmente visualizada como uma banda distinta de tamanho específico quando submetida a um processo de eletroforese em gel de agarose (ANDRADE et al, 2008).

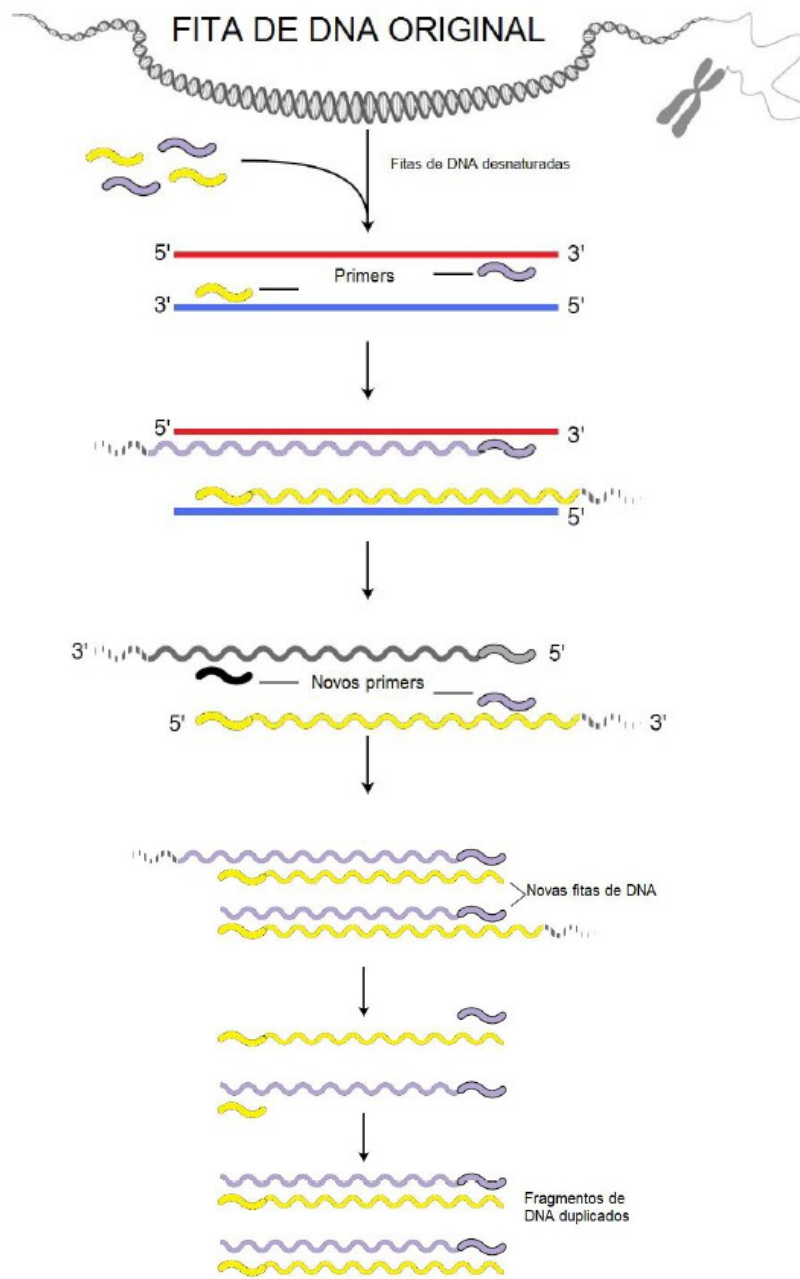


Ilustração 11: Esquema da reação de PCR, com visualização dos fragmentos. Adaptado de [http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/SGlossary/Illustration/Pdf/reaccion_de_la_cadena_de_la_polimerasa_\(PCR\).pdf](http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/SGlossary/Illustration/Pdf/reaccion_de_la_cadena_de_la_polimerasa_(PCR).pdf). Acesso em 27 Out.2009.

3.3.2.1 Tipos de PCR

3.3.2.1.1 Nested PCR

Nested-PCR é uma variação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), onde ao invés de um par de primers, são utilizados dois para amplificar um fragmento em dois ensaios separados de PCR (PCRStation, 2009).

O primeiro par amplifica a seqüência alvo, assim como na PCR padrão. Porém, um segundo par de iniciadores denominados nested primers (primers aninhados) alojam-se dentro do primeiro produto da PCR, permitindo a amplificação de um segundo produto, mais curto e específico que o primeiro (Figura 12) (PCRStation, 2009).

A vantagem da técnica é que se o fragmento errado for amplificado na reação de PCR, a probabilidade de que tal região seja novamente amplificada pelo segundo par de primers é praticamente nula, portanto, Nested PCR é uma reação em cadeia da polimerase mais específica (PCRStation, 2009).

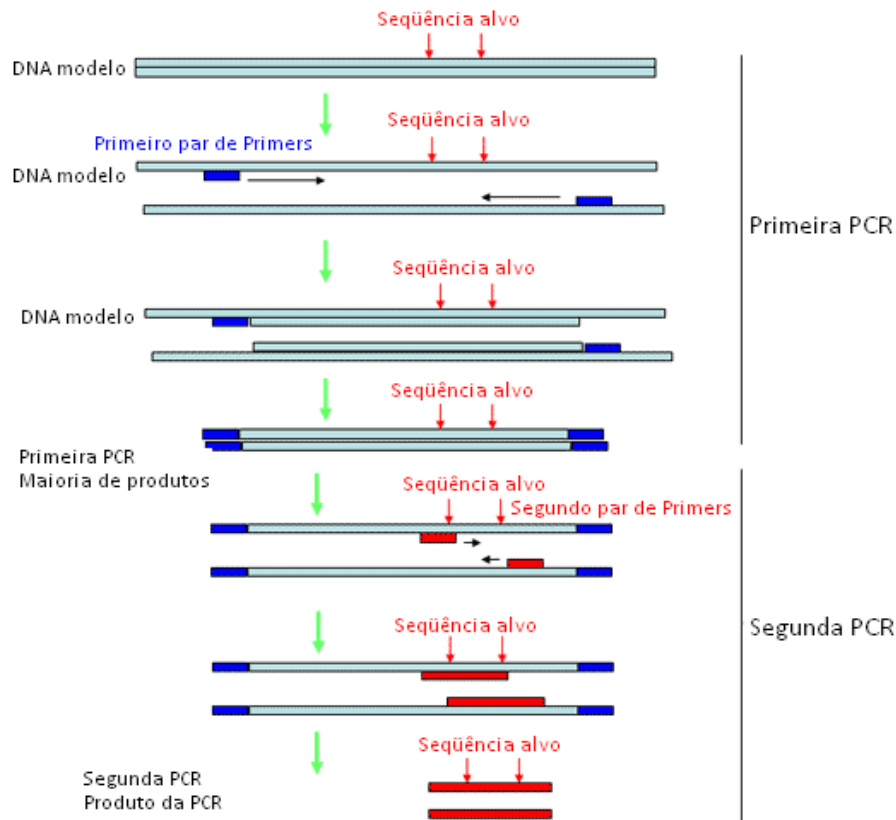


Figura 12: Representação da técnica de Nested-PCR. Adaptado de <http://www.pcrstation.com/nested-pcr/>. Acesso em 22 Out.2009.

3.3.2.1.2 PCR em Tempo Real

PCR em tempo real é uma variação da técnica que associa a metodologia padrão a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação (Figura 13). Tal metodologia permite a amplificação, detecção e quantificação de DNA em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações (MACIEL et al, 2004).

A possibilidade de monitorar, ao longo da reação, a quantidade de produto formado a cada ciclo de amplificação e quantificá-lo durante a sua fase de formação, confere maior precisão e reprodutibilidade à PCR em tempo real quando comparado com a PCR convencional (MACIEL et al, 2004).

O equipamento utilizado na realização da técnica é um termociclador associado a um leitor de fluorescência capaz de medir a luz proveniente de uma reação de amplificação. A metodologia utiliza os mesmos reagentes de uma PCR convencional acrescido de fluorocromos, intercalados em cadeias de DNA ou presentes em sondas de hibridização específicas (MACIEL et al, 2004).

O sistema é baseado no uso de uma sonda (uma fita simples de DNA), dirigida contra uma região interna da seqüência alvo, e que contém um fluorocromo em cada extremidade. Na extremidade 5' há um fluorocromo que só fluoresce se estiver distante fisicamente do fluorocromo na posição 3' (MACIEL et al, 2004).

Este segundo fluorocromo funciona como capturador de energia (*quencher*) e não permite que a energia luminosa usada para excitar a sonda chegue em quantidade suficiente para excitar o primeiro fluorocromo. Estes dois fluorocromos são representados como R e Q (para *quencher*) (MACIEL et al, 2004).

Quando o primer hibridiza na região 5', a sonda também o faz no meio da seqüência. Conforme a Taq polimerase avança sintetizando a fita nova, ela vai degradando a sonda à sua frente, liberando o fluorocromo R da sonda e permitindo a emissão de luz e absorção da energia, proveniente de um feixe de laser (MACIEL et al, 2004).

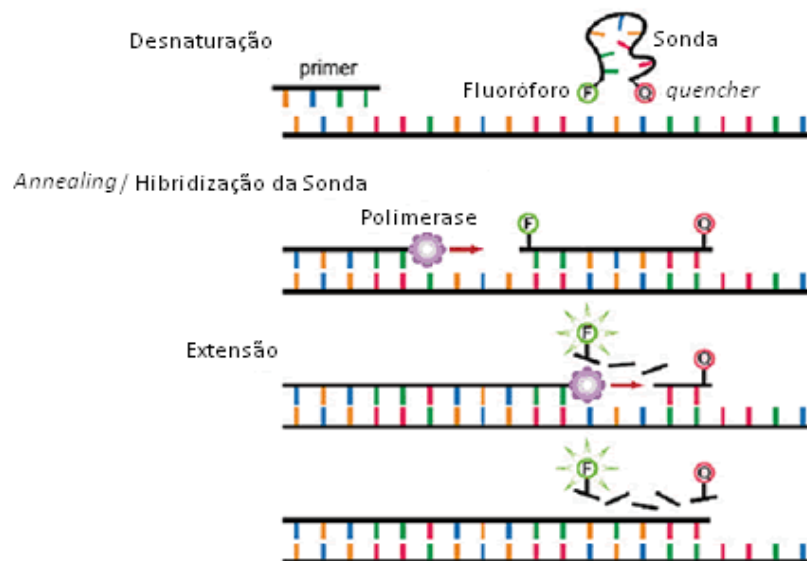


Figura 13: Esquema de PCR em tempo real. Adaptado de http://biomed.lsu.edu/images/PCR_TPM.gif. Acesso em 29 out. 2009.

Na presença de produto amplificado, os fluorocromos, excitados por uma fonte de luz, emitem um sinal proporcional à quantidade de produto sintetizado que, por sua vez, será proporcional à quantidade inicial de seqüências-alvo presentes na reação de amplificação (MATTEI et al, 2008).

Um sistema óptico é responsável por detectar os sinais emitidos, produzidos à medida que o produto é amplificado. Estes então são expressos graficamente, permitindo o monitoramento em tempo real da cinética e eficiência da reação de amplificação (MACIEL et al, 2004).

A quantificação do produto amplificado é feita através de comparação com uma curva padrão que correlaciona a intensidade dos sinais de fluorescência com as concentrações conhecidas de uma seqüência idêntica a que se quer quantificar (MATTEI et al, 2008).

A análise da reação é confirmada através de uma curva (Curva de Melting), responsável por indicar o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos primers específicos para as seqüências-alvo em questão. Amostras de caráter homozigoto representam na curva uma mudança no sinal de apenas dois fluoróforos, enquanto as heterozigotas apresentam mudança no sinal de fluorescência referente a ambos os fluoróforos (MATTEI et al, 2008).

3.3.2.1.3 *PCR Multiplex*

A PCR Multiplex (mPCR) é uma variação da PCR convencional empregada de maneira crescente nos últimos anos. O diferencial desta técnica é a utilização de mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilitando a amplificação simultânea de mais de uma seqüência de DNA, promovendo uma análise mais ampla, rápida e barata (SILVA, 2008).

Desde sua introdução, a mPCR tem sido aplicada com sucesso para obtenção de perfis genéticos de indivíduos, ao amplificar seqüências de hipervariação, como mutações, polimorfismos e deleções. É através desta técnica que são executados alguns testes de importância forense, como o de paternidade (ZAHA et al, 2003).

3.1.2.1.4 *RT-PCR*

A técnica de RT-PCR (Reverse Transcriptase Chain Reaction - Reação em cadeia da Transcriptase Reversa) compreende a síntese de cDNA (DNA complementar) com a

amplificação *in vitro* por PCR, possibilitando a clonagem de genes a partir dos respectivos mRNAs e análise de expressão genética (VIEIRA, sem ano).

A síntese de DNA é feita com uma transcriptase reversa que atua no RNA total ou numa fração enriquecida deste. A reação de PCR é feita com uma polimerase de DNA, tendo como molde o cDNA da reação anterior (VIEIRA, sem ano).

A reação é composta de duas partes: a transcrição reversa e a amplificação propriamente dita. Seu principal diferencial é que na verdade esta reação não parte de um molde de DNA diretamente extraído da amostra, a que amostra fornece o RNA, e este então é convertido em cDNA, pois não é possível estudar diretamente o RNA, devido à sua alta sensibilidade a vários fatores e a altas temperaturas (VIEIRA, sem ano).

As duas reações podem ser executadas num só tubo (one-step RT-PCR) com mistura de todos os componentes necessários às duas reações ou em dois passos (two-step RT-PCR) (VIEIRA, sem ano).

No primeiro caso, todos os componentes necessários às duas reações são misturados, e por haver menor número de manipulações com o material, mostra-se vantajoso por apresentar uma menor probabilidade de contaminação, afinal, o tubo não é aberto entre a síntese do cDNA e a amplificação, além de ser mais sensível, pois a amplificação é realizada com todo o cDNA sintetizado (VIEIRA, sem ano).

No RT-PCR de dois passos, primeiro ocorre a síntese de uma cadeia de DNA, utilizando-se como molde uma cadeia de RNAm, numa reação catalisada por uma transcriptase reversa, para então ser realizada a amplificação propriamente dita (Figura 14) (VIEIRA, sem ano).

Tobin/Dusheck, Asking About Life, 2/e
Figure 13.7

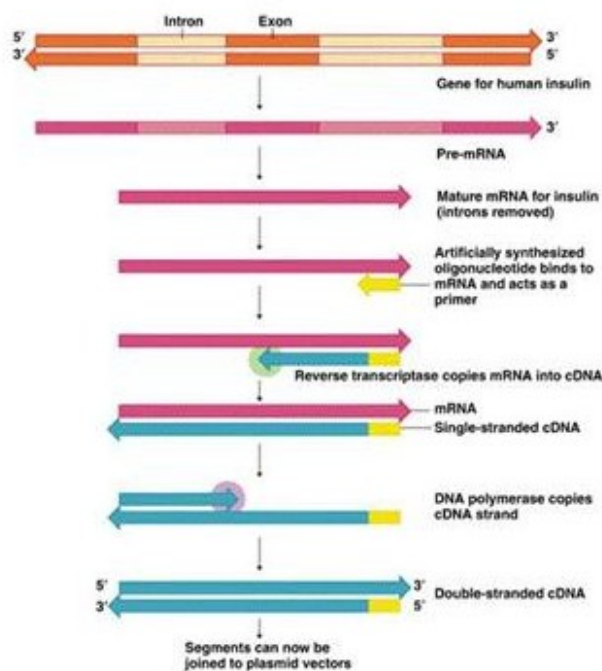


Figura 14 : Esquema da reação de RT-PCR

3.3.3 DNA FINGERPRINTING

Apesar de sua denominação, o termo *fingerprint* (impressão digital) não faz alusão ao sistema datiloscópico tradicional, mas sim a individualização obtida a partir da técnica, pois assim como nenhum indivíduo compartilha a mesma impressão digital, a seqüência estrutural do DNA também é específica para cada pessoa (SAKIYAMA et al, 2007).

Todo indivíduo possui uma seqüência característica de nucleotídeos que compõe o conteúdo das moléculas de DNA. A identificação de diferenças entre essas seqüências através de marcadores moleculares revela um padrão único, uma impressão digital genética, denominada DNA *fingerprint*, que pode ser utilizada para detectar diferenças e similaridades entre indivíduos, permitindo estabelecer com precisão vínculos genéticos para fins investigativos (Figura 15) (SAKIYAMA et al, 2007).

Como na maioria dos casos os vestígios encontrados em locais de crime são apresentados numa quantidade ínfima, a técnica se desenvolve por PCR multiplex, onde pares de primers cindem as seqüências hipervariáveis de interesse para posteriormente serem amplificadas. Feito isso, conforme a extensão da região repetitiva, fragmentos maiores ou menores são diferenciados através da eletroforese em gel de agarose, e a posição das bandas

produzidas dependerá do número exato de repetições no *locus*. A limitação da execução desta técnica utilizando a PCR justifica-se pelo tamanho da região polimórfica, que não pode ser muito grande, implicando num número menor de alelos utilizados (PEDROSA et al, 2005).

Na criminalística a técnica é largamente utilizada, afinal, quando comparado o DNA do infrator obtido na cena do crime com o DNA dos suspeitos, é possível identificar com grande fiabilidade a culpabilidade de algum destes. Nos casos de paternidade, o padrão do filho é colocado em comparação com o do suposto pai e com o da mãe, e como são herdados dois alelos, um de cada parente, a análise das regiões pode excluir ou incluir com uma certeza de até 99.99% a paternidade (GERARDO, sem ano).

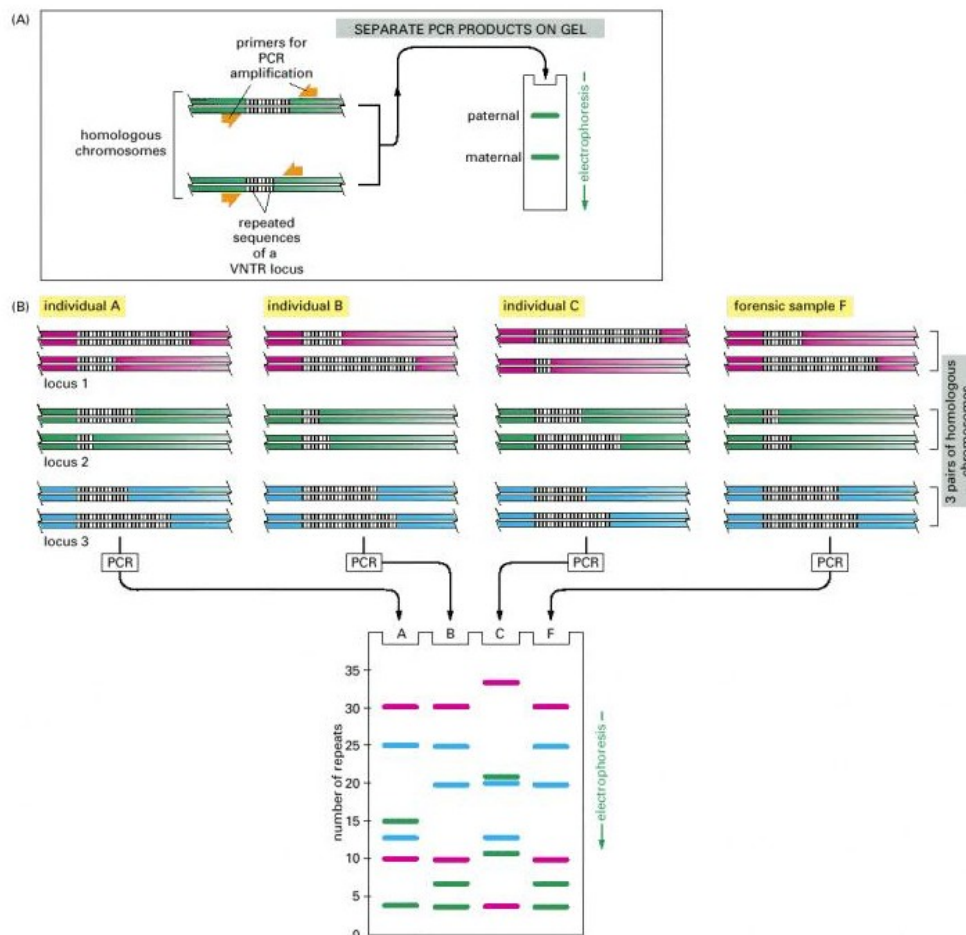


Figura 15: Esquema representando o uso da técnica para casos de elucidação de paternidade. Fonte: PEDROSA et al, 2005.

3.3.4 DNA MITOCONDRIAL

Após a extração do mtDNA, ele é submetido a uma reação de PCR, onde primers flanqueiam as regiões polimórficas de interesse. Após a amplificação o resultado é analisado por seqüenciamento. A diferença desse processo de seqüenciamento é que quando realizado

para a análise de amostras que contenham DNA nuclear, a técnica nos permite verificar os diferentes alelos a partir dos primers marcados com fluorescência, enquanto no mtDNA os nucleotídeos amplificados por PCR é que são marcados com fluoróforos, o que permite a leitura destes para enfim realizar as comparações necessárias (LIMA, sem ano).

3.3.5 ANÁLISE DO CROMOSSOMO Y

A técnica é realizada da mesma forma com que realiza-se a análise de microssatélites por PCR, utilizando-se o seqüenciamento com primers marcados com fluorescência. A técnica é aplicada em casos de elucidações de estupro onde ocorre a mistura de material biológico e testes de paternidade sem a mãe (LIMA, sem ano).

4 DISCUSSÃO

Mesmo que alcancem o objetivo desejado - a identificação de indivíduos através do DNA- as metodologias utilizadas têm seus prós e contras.

A técnica de RFLP foi a pioneira em termos de criação de um perfil genético, porém atualmente o método não é mais tão empregado, pois sua execução exige amostras grandes e recém-coletadas de DNA. Além disso, o teste demora aproximadamente de três semanas a um mês e requer o exame de seções múltiplas do feixe do DNA para localizar as variações, o que aumenta a probabilidade de ocorrer um erro humano que possa comprometer a confiabilidade do exame (ROCHA et al, 2006).

Já a clonagem de material genético através da PCR pode ser realizada em poucas horas usando um equipamento relativamente simples, cujo principio fundamental é a variação de temperatura conforme a mudança de etapa.

Cada ciclo individual da reação leva em geral de 3 a 5 minutos em um termociclador automatizado, equipamento geralmente utilizado. Tomando por base que são realizados em média 30 ciclos por reação, o processo inteiro totalizaria três horas, e mesmo que a construção e a síntese dos primers tomem algum tempo, existem desenvolvidos programas de computador que facilitam a síntese comercial dos oligonucleotídeos desejados (ZAHA et al, 2003).

A sensibilidade do processo é um fator que a destaca. A PCR é capaz de amplificar seqüências a partir de quantidades ínfimas do DNA alvo e até mesmo do DNA de uma única célula, mesmo quando a amostra encontra-se num elevado grau de degradação. Isso torna a técnica particularmente útil na análise forense, pois na maioria dos casos a quantidade de material biológico extraído das amostras é mínima e dificilmente nova e bem conservada (ANDRADE et al, 2008).

A principal desvantagem da PCR é sua limitação ao estudo de regiões genéticas pequenas (com poucas repetições), relativamente menos informativas para identificação. Outra limitação da técnica é o risco de contaminação do material genético. Se o DNA contaminante estiver presente em níveis comparáveis ao DNA alvo, sua amplificação pode confundir a interpretação da tipagem, conduzindo a conclusões errôneas (PENA, 2005).

Para minimizar tal possibilidade, um controle negativo deve ser empregado. Este deve ser feito na mesma reação de PCR, mas sem conter nenhuma amostra, e é necessária a separação física da área do laboratório destinada à prática da técnica.

A técnica de DNA Fingerprinting também possui uma alta sensibilidade, pois faz uso de uma reação de PCR. Através da análise de unidades repetitivas do genoma torna possível construir o padrão de um indivíduo, cuja probabilidade de ser semelhante ao de outra pessoa é praticamente nula, pois as seqüências estudadas são altamente variáveis na população, o que torna a técnica altamente confiável. Sua única incapacidade de diferenciação é no caso de gêmeos idênticos, pois estes possuem o mesmo perfil genético.

O Cromossomo Y e o DNA mitocondrial são dois recursos amplamente utilizados na área da identificação humana, pois permitem identificar a vítima e também colher informações sobre sua linhagem familiar paterna ou materna, respectivamente. No contexto forense, o interesse pelo DNA mitocondrial surgiu por vários motivos, dentre os relevantes estão a alta taxa mutacional (de 5 a 10 vezes maior que a apresentada pelo DNA nuclear), uma vez que a existência de poucos mecanismos de reparo permite que as variações nos nucleotídeos sejam acumuladas, além de seu constante uso em casos de grandes tragédias, pois apresenta uma maior abundância de material genético e maior resistência a degradação. Porém o mtDNA se mostra incapaz de apresentar resultados em casos de paternidade, pois o material genético neste caso provém apenas da mãe (ANDRADE, sem ano).

No cromossomo Y existem 3 regiões distintas, sendo duas homólogas ao cromossomo X e passíveis de recombinação. No entanto, a outra parte é exclusivamente paterna e não sofre tal recombinação, portanto é passada de pai para filho sem sofrer alterações excetuando raros casos de mutação nesta região, permitindo a análise genealógica paterna do indivíduo. Esta técnica é muito empregada em casos de herança (ANDRADE, sem ano).

5 CONCLUSÃO

A genética forense tem suas raízes embasadas na biologia molecular, uma área científica consolidada, com uma larga base empírica. Apresenta-se como uma especialidade dentro das ciências forenses, que utiliza o DNA para apoiar e auxiliar a justiça a desvendar casos onde a identificação biológica de parentesco, seja materna ou paterna, ou a identificação genética de indivíduos, através de amostras como manchas de sangue e fios de cabelos encontrados em locais de ocorrências de delitos ou restos cadavéricos de vítimas se mostre necessária.

Em termos de impacto social, é difícil estabelecer qualquer paralelo com alguma outra ferramenta empregada pela justiça, já que nenhuma se compara à investigação genética no tocante ao alto poder de discriminação. Portanto, a análise do DNA é um dos maiores trunfos da investigação criminal, representando um dos maiores progressos técnicos desde a descoberta das impressões digitais.

Evidências científicas constituem um importante componente de processos nas áreas civil e penal. A confiabilidade de uma relação indivíduo-específico conferida pelas amostras de DNA só é garantida por lei quando os devidos cuidados obrigatórios na execução dos procedimentos necessários para análise e conclusão do perfil genético, tais como coleta, extração, custódia e manipulação. Estes procedimentos devem ser cumpridos exatamente à risca, pois qualquer falha em alguma dessas etapas, por menor que seja, pode facilmente comprometer os resultados e, conseqüentemente, induzir a conclusões errôneas, uma vez que nenhuma prática pode ser considerada absolutamente infalível quando disposta a atividades humanas.

A tecnologia do perfil de DNA e os métodos relacionados à análise progrediram a tal ponto, que seus resultados alcançam conclusões exatas acerca da admissibilidade de dados genéticos quando adequadamente coletados e analisados.

A tendência é que num futuro não muito distante, com os crescentes avanços nesta área, as técnicas de biologia molecular já existentes serão aprimoradas e novos e melhores métodos sejam desenvolvidos, a fim de possibilitar desfechos cada vez mais indubitáveis em investigações forenses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, Fabiana Michelsen de; KOCH, Analara. **A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão.** 2008. Disponível em <http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_40_01/04.pdf>. Acesso em 15 Out. 2009.
- ANTONINI, Sandra Regina Ceccato; MENEGHIN, Silvana Perissatto; URASHIMA, Alfredo Seiti. **Técnicas Básicas de Biologia Molecular.** 2004. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/petagonomia/apostilas/apostilacurso_molecular_ufscar.pdf>. Acesso em 17 Out. 2009.
- ALBUQUERQUE, Trícia Cristine Kommers; MATTEI, Fabíola Salene. **Tecnologia Plexor para PCR em Tempo Real e sua Aplicação na Genética Forense.** 2008. Disponível em: <<http://www.pucrs.br/edipucrs/online/III Mostra/BiologiaCelulareMolecular/61923%20-%20FABIOLA%20SALENE%20MATTEI.pdf>> Acesso em 15 Out. 2009.
- BARALDI, Andréia Moribe. **Utilização da técnica de identificação genética: panorama da realidade dos serviços oficiais de identificação brasileiros e a importância da atuação do cirurgião-dentista na equipe forense.** 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23148/tde-08042009-160610/>> Acesso em 4 Nov. 2009.
- CAIXETA, Eveline Teixeira; OLIVEIRA, Antônio Carlos Baião de; SAKIYAMA, Ney Sussumu; ZAMBOLIM, Eunize Maciel; ZAMBOLIM, Laércio. **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento de plantas.** 2007. Disponível em: <[http://www.iac.sp.gov.br/BTonline/Documentos_IAC_81.pdf](http://www.iac.sp.gov.br/BTOnline/Documentos_IAC_81.pdf)> Acesso em 03 Nov. 2009.
- CARRAPA, Ana; COELHO, Joana; PEDROSA, Sara; SANTOS, João; ZÃO Ana. **Técnicas de análise de DNA aplicadas a diagnóstico.** 2005. Disponível em: <<http://medicina.med.up.pt/bcm/trabalhos/2005/tecnicasdeanalisede%20dna.doc>>. Acesso em 10 Nov. 2009.
- CHEMELLO, E. **Ciência forense: exame de DNA.** 2007. Disponível em: <http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007mar_forense4.pdf>. Acesso em 30 Out. 2009.
- COSTA, Luís Renato da Silveira; JOBIM, Luiz Fernando; SILVA, Moacir da. **Identificação Humana.** v.2. Campinas, Sp: Millennium Editora, 2005.
- DOLINKSKY, Luciana Cresta; PEREIRA, Lissiane Miranda Campelo Veras. **DNA Forense Artigo de Revisão.** 2007. Disponível em: <http://www.unigranrio.br/unidades_acad/ibc/sare/v02n02/galleries/downloads/artigos/A02N02P02.pdf> Acesso em 15 Out. 2009.
- FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION (FBI). **Handbook of forensic services: Evidence examinations – DNA general.** Disponível em: <<http://www.fbi.gov/hq/lab/handbook/examsdna.htm>>. Acesso em 26 Out. 2009.
- FIGUEIREDO, André; SMARRA, André; PARADELA, Eduardo. **A Identificação Humana por DNA: aplicações e limites.** Disponível em: <<Http://www.ambito-juridico.com.br>> Acesso em 14 Mar.2009.

FREEMAN, Shana. **Como funcionam os perfis de DNA**. 2008. Disponível em <<http://pessoas.hsw.uol.com.br/prova-de-dna3.htm>>. Acesso em 28 Out. 2009.

GRECO, Alessandro. **Impressão digital: assinatura do crime**. 2009. Disponível em: <<http://historia.abril.com.br/ciencia/impresao-digital-assinatura-crime-434121.shtml>> Acesso em 2 Jul. 2009.

INTERNACIONAL CRIMINAL POLICE ORGANIZATION (INTERPOL). **INTERPOL handbook on DNA data exchange and practice**. Disponível em: <<http://www.interpol.int/Public/Forensic/dna/HandbookPublic.pdf>>. Acesso em 26 Out. 2009.

MACIEL, Lila; PEREIRA, Fabiana. **PCR quantitativo em tempo real**. 2004. Disponível em: <<http://www.publicacoesweinmann.com.br/2009/04/pcr-quantitativo-em-tempo-real.html>> Acesso em 19 Out. 2009.

MORETI, Tiago. **Identificação Humana: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina**. 2009. Disponível em: <<http://www.tede.ufsc.br/teses/PBTC0135-D.pdf>>. Acesso em 13 Set. 2009.

MUSSE, Jamilly de Oliveira. **A influência do eio aquático nos processos de identificação humana: um estudo epistemológico e laboratorial (recuperação do DNA)**. 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23148/tde-16052007-120412/>> Acesso em 3 Nov. 2009.

PCRStation. **Nested PCR**. 2009. Disponível em: <<http://www.pcrstation.com/nested-pcr/>> Acesso em 22 Out. 2009.

PENA, Sérgio. **Segurança pública: determinação da identidade genética pelo DNA**. 2005. Disponível em: <<http://www.cgee.org.br/cncti3/Documentos/Seminariosartigos/Inclusaosocial/DrSergio%20Danilo%20Junho%20Pena.pdf>> Acesso em 16 out. 2009.

PEREIRA, Eloísa Elaine Miranda; ROCHA, Nágela Patrícia Amaral. **DNA: Análises para certeza**. 2006. Disponível em: <<http://www.diretrizcolegio.com.br/Analises%20para%20Certeza.ppt>> Acesso em 10 Nov. 2009.

PINHEIRO, Maria de Fátima. **Genética, Biologia Forense e Criminalística**. 2004. Disponível em: <<http://medicina.med.up.pt/legal/NocoasGeraisCF.pdf>> Acesso em 17 Out. 2009.

PEREIRA, Eloísa Elaine Miranda; ROCHA, Nágela Patrícia Amaral. **DNA: Análises para certeza**. 2006. Disponível em: <<http://www.diretrizcolegio.com.br/Analises%20para%20Certeza.ppt>> Acesso em 10 Nov. 2009.

QUEIROZ, Maurício Miranda de. **O uso do DNA na investigação policial**. 2008. Disponível em: <<http://www.sare.unianhanguera.edu.br/index.php/rdire/article/view/Article/54>> Acesso em 13 Jun. 2009.

REMUALDO, V.R. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de dentes humanos submetidos ao calor**. 2004. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10229/31115>> Acesso em 15 Out. 2009.

RUMJANECK, Franklin David. **Introdução à Biologia Molecular**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2001. p. 9-59.

SILVA, Marisa Araújo. **Utilização de PCR Multiplex para o Diagnóstico Etiológico da Mastite Bovina**. 2008. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/SSLA-7UWHS2/1/disserta__o_formatada_marisa_19_5.pdf> Acesso em 19 Out. 2009.

VIEIRA, Daniel Perez. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. Sem ano. Disponível em: <http://www.credesh.ufu.br/documentos/academico/Principios_da_PCR_IPEN.pdf> Acesso em 23 Out. 2009.

ZAHA, Arnaldo.; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Lucia Maria Pereira. **Biologia Molecular Básica**. 3º ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. P 399-413.