

DNA FORENSE

ARTIGO DE REVISÃO

Luciana Cresta Dolinsky¹, Lissiane Miranda Campelo Veras Pereira¹

¹Ciências Biológicas – IBC, Universidade do Grande Rio-Unigranrio

RESUMO

Este trabalho tem a importância de conceituar, por meio de diferentes percepções, o DNA forense, bem como caracterizar seu uso e aplicações. As técnicas forenses permitem identificar pessoas pela análise de suas moléculas de DNA podendo, inclusive, auxiliar a justiça na identificação de criminosos, utilizando análise de STRs e VNTRs. Estas análises são feitas em laboratórios de análise de DNA, e utilizam qualquer tipo de tecido ou fluido biológicos que possam ser utilizados como fonte de DNA, uma vez que são formados por células.

Palavras-chave: DNA Forense, identificação, material biológico.

ABSTRACT

The main importance of this work is to characterize use and applications of forensic DNA. The forensic techniques can identify people by DNA molecular analysis including criminal analysis, using STR's and VNTR's, to help justice. These analysis are made in DNA's laboratories and can use as DNA source any samples of tissue or biological fluids, composed by cells.

Keywords: Forensic AND, identification, biological samples.

INTRODUÇÃO

O primeiro caso de identificação criminal através de exames de DNA ocorreu em 1985, na Inglaterra. Num pequeno condado, rodeado de montanhas e com uma única estrada de acesso, uma mulher foi estuprada e assassinada. "Lá havia um geneticista, Alec Jeffreys, que colheu o esperma encontrado na vítima e fez o exame de DNA. Mais tarde houve outro crime similar. Novamente Jeffreys analisou o sêmen encontrado na vítima. Era do mesmo homem que cometera o primeiro crime", conta José Maria Marlet, professor de medicina legal da USP. As autoridades locais forjaram uma campanha de doação de sangue cuja finalidade era identificar o agressor. Todos os habitantes foram doar sangue, mas nenhum deles possuía DNA igual ao do estuprador. "A polícia prosseguiu com as investigações e descobriu que havia um viajante no condado. Quando o sujeito voltou, foi convidado a doar sangue. Feito o teste de DNA no sangue colhido, Jeffreys concluiu que o código genético do viajante era o mesmo do estuprador", conta Marlet (AMABIS & MARTHO, 1995).

A identificação humana por DNA é uma ferramenta poderosa para casos de paternidade, assim como investigação criminal pela tipagem de

O perfil de DNA ou Perfil genético tem sido considerado um método importante na identificação individual, pois a informação contida no DNA é determinada pela seqüência como as letras do alfabeto genético estão dispostas nos cromossomos. No caso do homem, existem três bilhões dessas letras escritas nos cromossomos de cada célula do corpo humano, sempre na mesma ordem em todas as células do indivíduo. É a ordem como essas letras estão escritas nos cromossomos que faz com que cada indivíduo seja diferente dos demais. Quanto mais diferentes são os indivíduos, mais distinta é a ordem das letras no genoma. Indivíduos aparentados, irmãos, pais e filhos, etc, apresentam proporcionalmente maior similaridade na seqüência gênica. Somente gêmeos idênticos, que são clones humanos naturais, apresentam a mesma

evidências biológicas coletadas em cenas de crime como estupro, homicídio, rapto, troca ou abandono de crianças e também na identificação de restos mortais em desastres ou campos de batalha. Contudo, devem-se utilizar os conhecimentos científicos, tecnológicos e métodos de análise, para que essa associação seja feita de maneira correta.

As evidências biológicas (manchas de sangue, sêmen, cabelos, etc.) são encontradas em cenas de crimes e o DNA pode ser extraído dessas evidências e estudado por técnicas moleculares no laboratório, permitindo a identificação do possível suspeito. Assim, para que a técnica de identificação pelo DNA seja plenamente realizada, a amostra biológica a ser analisada deve ser corretamente escolhida, transportada, coletada e armazenada (SILVA & PASSOS, 2006).

O uso do DNA Forense na investigação criminal, não pode por si só provar a culpabilidade do criminoso, e também a inocência do mesmo, mas pode estabelecer uma ligação entre esta pessoa e a cena do crime. Atualmente a identificação humana por DNA Forense, já é aceita em processos judiciais em todo o mundo, sendo possível inclusive à identificação de pessoas mortas, a dezenas, centenas de anos, utilizando DNA obtido de ossos ou dentes.

ordem ou seqüência gênica (BORÉM *et al.*, 2001).

No perfil de DNA, somente algumas regiões do DNA são analisadas. As regiões escolhidas são aquelas que apresentam maior variação individual e facilidade de estudo. Essas regiões são denominadas de marcadores genéticos ou moleculares. Os marcadores moleculares podem ser utilizados para caracterizar o DNA de um indivíduo em um padrão ou perfil de fragmentos que lhe é particular. Neste caso são utilizados marcadores polimórficos, ou seja, regiões que apresentam mais de um alelo por locus; em loci forenses, o alelo mais comum tem a frequência menor que 0,6 (DUARTE *et al.*, 2001).

O método de STR (*Short Tandem Repeats*) é mais usado hoje em dia, e estuda regiões repetitivas de DNA chamadas de minissatélites (VNTRs) e microsatélites (STRs). Na

identificação humana utiliza-se quase que exclusivamente marcadores microssatélites STR. O estudo dos marcadores STR é feito utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). Com essa técnica é possível fazer a tipagem do DNA utilizando quantidades mínimas de amostras, como fio de cabelo, células coletadas na borda de um copo usado pelo suspeito ou manchas de sangue em uma arma. Esse processo se faz *in vitro* (em vidro) para fazer muitas cópias de um fragmento de DNA.

A tipagem do DNA Forense se baseia nos mesmos princípios fundamentais e usa as mesmas técnicas empregadas nas áreas médica e genética, tais como o diagnóstico e mapeamento genético, que analisam o próprio DNA.

O sucesso da tipagem de DNA depende basicamente da qualidade e quantidade de DNA extraído das diversas fontes. Nos exames de paternidade, o DNA é geralmente extraído de amostras colhidas em condições ideais: sem contaminação e com material genético íntegro. Já na determinação de identidade, o material obtido nem sempre está em boas condições: às vezes há pouco DNA, ou este está contaminado ou degradado. Nesses casos, a extração de DNA adequado para a análise talvez seja a etapa mais importante do processo.

São também analisados polimorfismos presentes no DNA mitocondrial e no cromossomo Y, que são usadas em algumas ocasiões. Mais recentemente, os abundantes polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) e os polimorfismos de inserção/deleção (indels) têm emergido como possíveis alternativas (LIMA, 2006).

USO FORENSE DO DNA

O DNA Forense é usado hoje na esfera criminal, para a investigação criminal e na esfera civil, para investigação de paternidade.

O DNA Forense é aplicado na identificação de suspeito em casos de crimes sexuais (estupro, atentado violento ao pudor, ato libidinoso diverso da conjugação carnal); identificação de cadáveres carbonizados, em decomposição, mutilados, etc.;

relação entre instrumento lesivo e vítima; identificação de cadáveres abandonados; aborto provocado; infanticídio; falta de assistência durante o estado puerperal; investigação de paternidade em caso de gravidez resultante de estupro; estudo de vínculo genético: raptos, seqüestros e tráfico de menores; e anulação de registro civil de nascimento (LEITE, *et al.*, 2005).

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

Amostras biológicas de Interesse Forense

Qualquer tipo de tecido ou fluido biológico pode ser utilizado como fonte de DNA, uma vez que são formados por células. Nas células, o DNA de interesse forense encontra-se tanto no núcleo como nas mitocôndrias (BEZERRA, 2004). Os tipos de amostras mais comuns são sangue, sêmen, cabelo, saliva, urina, pele, unha, ossos, líquidos amnióticos, vilosidade coriônica, fígado, músculo, suor, fezes.

Podem ocorrer degradação e contaminação de DNA nos laboratórios e nos locais de crime. A degradação biológica do DNA é feita por enzimas produzidas por fungo e bactérias, por causa da umidade e do calor. O DNA resiste bem ao calor (temperatura de até 100°C não o destrói), mas existe o problema da contaminação, que é a deposição de material biológico de outra pessoa na amostra. Por exemplo, num caso de estupro, quando o material coletado com swab pode conter sêmen (espermatozóide) do estuprador e fluido vaginal com células da vítima (SILVA & PASSOS, 2006).

Para um efetivo controle da integridade física do material biológico coletado, faz-se necessário a documentação de sua cadeia de custódia, que diz respeito à identificação de todas as pessoas que ficaram responsáveis pela guarda da amostra, e das condições em que as mesmas se encontravam a cada nova transmissão, desde a

coleta até sua análise em laboratório. As amostras biológicas merecem especial atenção devido a sua susceptibilidade à degradação e contaminação. Este controle é obtido mediante recibos assinados a cada transmissão de posse da amostra (SILVA & PASSOS, 2006).

INFORMAÇÕES SOBRE O DNA

Localização do DNA

O DNA está na forma de cromossomos microscópicos, localizados no interior da célula, no núcleo (DUARTE, 2001).

Fora do núcleo, no citoplasma da célula também é encontrado DNA de interesse forense. Este DNA está localizado nas mitocôndrias, organelas especializadas na produção de energia. Nos estudos rotineiros de identificação humana somente se estuda DNA nuclear.

Nos casos em que não é possível a tipagem utilizando-se DNA nuclear, pode ser usado DNA mitocondrial. Por exemplo, fios de cabelos que não possuem mais bulbos e ossos antigos podem ser utilizados para extração de DNA mitocondrial. Qualquer tecido ou fluido biológico pode ser utilizado como fonte de DNA, desde que possua células próprias ou células de outros tecidos. Por exemplo, na urina podemos encontrar células oriundas da bexiga, mucosa do pênis e células brancas do sangue, que podem ser utilizada em estudos de identificação. Da mesma forma podem ser encontradas células na saliva, lágrimas, suor, e em outras substâncias orgânicas (SILVA & PASSOS, 2006).

Nos seres humanos, o DNA que carrega o código genético ocorre em todas as células que possuem núcleo, inclusive os glóbulos brancos, os espermatozoides, as células que envolvem as raízes capilares e as células encontradas na saliva. Estas são as células que oferecem maior interesse para os estudos forenses (DUARTE, 2001).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é de origem extranuclear, e seu genoma circular é encontrado em grande quantidade no citoplasma das células. Esse DNA foi completamente seqüenciado, e a região que possui variações de seqüência é

chamada de região controle. Uma das características de interesse é o seu caráter monoclonal, sendo que todo o mtDNA de um indivíduo apresenta a mesma seqüência. Entretanto, uma condição chamada de heteroplasmia pode existir, quando uma pessoa apresenta mais de um tipo de mtDNA. Dessa maneira, a análise de fios de cabelo pode demonstrar resultados diferentes ou ambíguos (JOBIM *et al.*, 2006).

O mtDNA é um marcador genético de grande interesse na área forense, pois uma única célula possui mais de 5.000 cópias de mtDNA, associados à resistência do mtDNA com estruturas circular, à digestão enzimática. Assim, em grandes desastres (incêndios, explosões, queda de aviões), quando é mais difícil identificar os corpos, analisa-se o mtDNA e compara-se com seqüências obtidas de possíveis irmãos ou ascendentes maternos (LIMA, 2006).

Utiliza-se mtDNA quando a amostra em questão tem uma quantidade pequena ou não tem DNA nuclear; como, por exemplo, quando a única amostra que temos do possível criminoso é um pêlo ou cabelo sem bulbo. A técnica também pode ser usada quando se quer fazer um exame de maternidade e não se tem o pai. O mtDNA é de herança materna, sendo que recebemos esses marcador de nossas mães e temos identidade com nossos irmãos e parentes próximos pela linhagem materna (JOBIM, *et al.*, 2006).

O cromossomo Y (crY) é transmitido pelo pai somente para os filhos homens, e a análise destas regiões pode fornecer importante informação quanto à origem parental dos indivíduos, embora não forneça informação indivíduo-específico.

Seus microssatélites são importantes na análise forense do DNA. Devido à falta de um cromossomo homólogo, não existe recombinação durante a meiose. Só são identificados alelos de origem masculina, herdados em bloco dos antepassados masculinos. A herança em bloco de alelos de diferentes STR do mesmo cromossomo é denominada herança haplotípa, e o conjunto dos alelos chamam-se haplótipos (JOBIM, *et al.*, 2006). A análise de microssatélites existentes no cromossomo Y (crY) tem sido utilizada para

elucidar casos de estupro onde se tem mistura de material biológico e, por isso, de DNA. Além disso, pode-se realizar teste de paternidade sem a mãe (LIMA, 2006).

No cromossomo Y existem três regiões distintas. Duas pequenas regiões são homólogas ao cromossomo X e podem sofrer recombinação. No entanto, há uma parte do cromossomo Y que é exclusiva e que não sofre recombinação com o cromossomo X e por isso é passada de pai pra filho sem sofrer qualquer alteração (LIMA, 2006). Estudos apontam um baixo índice de mutação, podendo os mesmos haplótipos serem encontrados em varias gerações de homens, alcançando talvez algumas centenas de anos (JOBIM, *et al.*, 2006).

Enquanto que no estudo de microssatélite de DNA de cromossomos somáticos um mesmo indivíduo pode possuir dois alelos, diferentes ou não, para a mesma região (o que significa homo ou heterozigidade), no estudo de microssatélite de cromossomo Y, cada homem possui apenas uma alelo, uma vez que possui apenas um cromossomo Y (LIMA, 2006).

REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DA MOLÉCULA DE DNA

A análise de DNA tem como objetivo diferenciar um indivíduo de outro, através de um grande número de características, dando-lhe uma identidade absoluta como pessoa, podendo assim ser diferenciado dentre bilhões de outras (BONACCORSO, 2004). A variabilidade humana em termos de DNA é enorme. Dois genomas humanos escolhidos ao acaso diferem aproximadamente em um de cada 500 pares de bases do DNA (nucleotídeos). Como o genoma humano tem cerca de 3.109 pares de bases, isto implica em 6 milhões de diferenças entre duas pessoas (LEE & GAENSSLEN, 1990; BONACCORSO, 2004).

Na espécie humana existem cerca de 50 mil genes que codificam, através de RNA, proteínas. Estes genes codificadores de proteínas representam, aproximadamente, 10% do genoma. Todo o restante trata-se de seqüências repetitivas

que têm função estrutural (PENA, 1997). É a variabilidade deste restante, quais sejam as regiões hipervariáveis ou polimórficas, de função estrutural, que se utiliza nos exames forenses de DNA (BONACCORSO, 2004).

Tipos de polimorfismo

Os polimorfismos presentes nas regiões hipervariáveis do DNA podem ser agrupados em dois tipos: polimorfismos de comprimento e polimorfismos de seqüência.

O primeiro tipo inclui as regiões STR (*"short tandem repeat"*) e VNTR (*"variable number of tandem repeat"*), e é caracterizado por seqüências de nucleotídeos que se repetem em múltiplas cópias, variando o número de repetições entre os indivíduos para cada locus.

Os polimorfismos de seqüência são compostos de diferentes nucleotídeos em uma determinada localização do genoma. Estas variações em seqüência podem ser manifestadas como regiões de alelos alternativos ou substituições, adições ou deleções de bases. Em geral, originam-se de mutações pontuais (PARADELA *et al.*, 2006).

A grande diversidade nestas regiões é que o número de repetições de uma dada seqüência de bases, que pode ser de 1 a 4 bases nos STRs e de 10 a 100 pares de bases nos VNTRs, varia entre indivíduos. Assim, em função da quantidade de repetições presentes, cada indivíduo terá um tamanho diferente para a região do DNA que contém um dado STR ou VNTR. Cada possibilidade de tamanho (ou de número de repetições) que pode ser encontrada representa um alelo (LIMA, 2006).

Os minissatélites são formados por seqüências de vários nucleotídeos, por exemplo, (AATGCGGTACTGAGCC)_n, repetidas em números diferentes em cada indivíduo, dando-lhe uma característica única. Um locus de minissatélites pode ter muitos alelos em função do número de vezes (n) em que essa estrutura é repetida ao longo do DNA, deixando a população polimórfica em relação ao locus. Os loci de minissatélites são conhecidos também como número variável de repetições em seqüência

(VNTR, do inglês *variable number of tandem repeats*) (JOBIM, *et al.*, 2006).

Os loci de microssatélites, ou repetições curtas consecutivas (STR, do inglês *short tandem repeats*), são parecidos com minissatélites, mas com estrutura repetida menor (GATA)_n (JOBIM *et al.*, 2006).

Para a identificação de indivíduos é necessário a utilização de regiões polimórficas de DNA. Quanto mais loci são testados, maior a probabilidade de acerto. Para testes de paternidade e forense, até 18 loci diferentes são testados. Normalmente são utilizados STR (*short tandem repeats*), que são regiões repetitivas de DNA (de 1 a 4 nucleotídeos), altamente polimórficos (polimorfismo de tamanho) e facilmente tipados.

As bases para a utilização dos testes de identificação da individualidade humana, pelo estudo, do DNA, encontram-se na diversidade ou polimorfismo dos diversos loci de minissatélites, microssatélites ou HLA (antígenos leucocitários humano). Cada um de nós apresenta um cromossomo materno e um paterno, e as segregações destas estruturas repetitivas seguem a lei de Mendel, em que um alelo é de origem materna e outro, paterna, para cada locus (JOBIM, *et al.*, 2006).

Técnicas de detecção do DNA

Após a extração do DNA presente no material em questão, segue-se a análise dos polimorfismos genéticos. Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas técnicas para estudo de diferentes tipos de polimorfismos de DNA, no qual os cientistas e laboratórios podem escolher o método mais adequado para solucionar o problema. A expressão correta é “teste em DNA” (LIMA, 2006).

O polimorfismo de tamanho para fragmento de restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), é uma técnica em que os organismos podem ser diferenciados pela análise de padrões derivados da clivagem do seu DNA. Se dois organismos diferirem na distância entre os sítios de clivagem de uma endonuclease de restrição, o comprimento dos fragmentos produzidos vai diferir quando o DNA for digerido

com uma enzima de restrição (CARRAPA, A *et al.*, 2005).

Para a detecção de RFLP's, pode ser usada a metodologia de “*Southern Blot*”, descrita em 1975 por Edmund Southern, que permite a identificação de fragmentos de DNA com seqüências idênticas ou similares à sonda utilizada, e pode também auxiliar no posicionamento relativo de diferentes fragmentos dentro de um fragmento maior de DNA. Essa técnica pode ser utilizada também na identificação de polimorfismos que determinam a alteração de clivagem obtidos a partir de uma determinada região do DNA (RFLP) (ZAHA, 2003).

Após restrição enzimática os fragmentos de DNA genômico são sujeitos à eletroforese em gel e são transferidos para um suporte sólido de nitrocelulose através do arrastamento por capilaridade. Após hibridização com sondas radioativas, este processo possibilita a identificação, entre milhares de fragmentos de restrição obtidos, de seqüências bem determinadas. (CARRAPA *et al.*, 2005).

Os VNTR são seqüências curtas de bases que ocorrem em números variáveis dentro dos grupos de repetições em tandem (são encontrados próximos uns aos outros). O número de repetições encontradas em um grupo pode variar de um local para o seguinte dentro do genoma de um determinado indivíduo, e irá variar entre indivíduos, exceto em gêmeos idênticos (MALACINSKEI, 2005; ZAHA, 2003).

Existem dois tipos de repetições: repetições de microssatélites ou STR, que são repetições curtas em tandem de 2 a 5 nucleotídeos ocorrendo em muitos locais pelo genoma inteiro, e as repetições minissatélites, que são unidades de repetições maiores de 30 a 35 pares de bases contendo uma seqüência-terna comum mais curta. Essas repetições tendem a ocorrer em menos locais dentro do genoma do indivíduo (MALACINSKEI, 2005).

Para detectar os padrões de VNTR, o DNA é cortado com uma enzima de restrição que não corta o VNTR, mas corta para incluir todo o trecho repetido. Os fragmentos de restrição produzidos são separados via eletroforese em gel. A transferência de Southern é feita, usando sonda

radioativa que se hibridiza com a unidade básica de repetição. Com a radiografia, se revela a presença de um grande número de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes que se hibridiza com a sonda. O número de repetições em tandem difere de um indivíduo para o outro, e o que ocorre é um padrão altamente individual de fragmentos de DNA, chamado de *fingerprint* de DNA, que é usado hoje na área forense (MALACINSKEI, 2005).

Portanto, pequenas amostras de DNA, presentes em uma gota de sangue, fragmentos de pele ou folículo capilar podem ser amplificadas via PCR e usadas para inocentar ou incriminar um suspeito (MALACINSKEI, 2005). Apresentam um padrão que varia de pessoa para pessoa, exceto em gêmeos idênticos (ZAHA, 2003).

Os VNTR têm uma taxa de mutação muito elevada, o que leva a alteração em seu comprimento. Cada mutação altera o comprimento em apenas uma ou poucas unidades de repetição. O resultado é um número muito grande de alelos, nenhum deles sendo comum (DUARTE, 2001).

As sondas de DNA são curtos seguimentos de fita simples, marcados química ou radioativamente, que são usadas para detectar a presença de uma seqüência particular de DNA através de hibridização à sua seqüência complementar (DUARTE, 1999).

Existem sondas unilocais (SLP), que estudam cada locus individualmente, e sonda multilocais, que avaliam muitos loci ao mesmo tempo, conhecidos como impressão digital do DNA (JOBIM *et al.*, 2006 a *pud* JEFFREYS, 1987).

As sondas unilocais (SLP) analisam cada locus de minissatélites do DNA (VNTR) individualmente pelo método de RFLP, permitindo a observação de alelo de origem materna e outro de origem paterna (JOBIM *et al.*, 2006 a *pud* Balazs, 1993).

Os sistemas de SLP são adotados por serem mais sensíveis, mais facilmente interpretados e por possuírem uma genética definida (JOBIM *et al.*, 1999).

As sondas multilocais estudam um grande polimorfismo na mesma reação, com isso podem

confundir o técnico pela quantidade exagerada de bandas de DNA existente. Esses testes têm sido pouco utilizados. Atualmente os STR são mais utilizados na área forense.

A PCR foi descrita em 1985, por Kary Mullis que, em 1993, recebeu o prêmio Nobel em química por seu feito. Desde o início, a PCR foi reconhecida como uma resposta em potencial para quantidade de líquido biológico frequentemente encontrado na área forense. Estas amostras são diminutas para serem utilizadas com os métodos de RFLP (JEFFREYS *et alii*, 1988).

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), é uma técnica qualitativa simples, pelo qual moléculas de DNA ou DNA complementar são amplificadas milhares de vezes ou milhões de vezes de uma forma bastante rápida. Todo o procedimento é realizado *in vitro*, gerando DNA em quantidade suficiente para análises posteriores. A técnica é extremamente sensível, possibilitando a amplificação de DNA a partir de uma quantidade mínima de amostra (ZAHA, 2003).

O DNA é resistente a muitas condições que destroem a maioria dos outros compostos biológicos, como as proteínas, e somente pequenas quantidades de DNA são necessárias.

A PCR tem um grande potencial na medicina forense. Sua sensibilidade torna possível utilizar uma amostra bastante pequena (traços mínimos de sangue e tecido que poderiam conter os restos de somente uma única célula) e ainda se obter uma “impressão digital de DNA” da pessoa da qual a amostra foi coletada, podendo assim fazer comparações com aqueles obtidos de vítimas e suspeitos de casos de infração penal (SILVA & PASSOS, 2006).

Os loci de microssatélites conhecidos como STR (*short tandem repeats* ou repetições curtas consecutivas) apresentam alelos ou fragmentos de DNA de 100 a 300 pares de bases, e são usados na análise pericial de casos de identificação humana em que a amostra é escassa ou parcialmente degradada (JOBIM *et al.*, 2006 a *pud* MULLIS, 1987; HOCHMEISTER, 1998).

Nas regiões polimórficas, o genoma de cada ser humano (exceto dos gêmeos idênticos) é diferente, sendo possível amplificar essas regiões.

Portanto usa-se a pesquisa de STRs (*Small Tandem Repeats*) através da PCR, utilizando um conjunto de iniciadores que cobrem estas partes altamente variáveis do genoma humano, e podem gerar uma impressão digital característica de DNA para cada indivíduo (BRUCE, 1999).

Segundo JOBIM *et al* (2006), com a técnica, por exemplo, de PCR, pode se fazer a identificação do sexo do indivíduo que deixou o vestígio biológico. O locus da amelogenina apresenta um alelo de 106 pares de bases nas mulheres e um de 106 e outro de 112 pares de bases nos homens.

PCR Multiplex é a amplificação de diversos STR no mesmo tubo de ensaio. É uma técnica de PCR na sua forma mais simples, que amplifica regiões específicas do DNA, e utiliza um conjunto de iniciadores diferentes. Quanto mais regiões são amplificadas, mais confiável é a técnica e se tem o conhecimento prévio das seqüências (ou seja, do gene/ região de interesse).

Essa metodologia de amplificação múltipla depende de que a temperatura de anelamento dos *primers* seja idêntica e o tamanho dos alelos diferentes, para que possam ser analisados no mesmo gel de poli-acrilamida, corado com prata, ou identificado pelo laser de um seqüenciador automático. A possibilidade de marcação dos loci de STR com diversos fluorocromos permite a identificação dos multiplex de tamanhos semelhantes (JOBIM *et al.*, 2006 a *pub* BRI NKMAN, 1998).

Atualmente, são comercializados produtos que amplificam até 16 loci em uma única reação de PCR, analisando-se o produto amplificado pela PCR em seqüenciadores de DNA. Escalas alelicas (*ladders*) possibilitam a identificação dos alelos existentes nos loci analisados (JOBIM *et al.*, 2006).

Os marcadores bialélicos (SNP's), tem sido muito utilizado na genética forense, mesmo com seu pequeno poder de discriminação. Mais de um milhão de SNP estão dispersos no genoma humano, sendo que em cada loco, existe a possibilidade da existência de somente um (homozigose) ou dois nucleotídeo (heterozigose). A possibilidade de amplificação em forma de

multiplex facilita a utilização dessa tecnologia (JOBIM, *et al.*, 2006).

Essa técnica é recente e sofisticada. A grande vantagem sobre os microssatélites é que podem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos (50pb ou menos), sendo muito úteis quando se tem DNA muito degradado (LIMA, 2006).

PERFIL DO DNA

O perfil de DNA é uma simples e rápida maneira de se comparar seqüências de DNA de dois ou mais indivíduos. O exame de perfil do DNA também pode ser usado para casos de disputa por propriedade de linhagens e variedades melhoradas, paternidade, determinação de sucessão de bens por herança, propriedade de órgãos construídos em laboratório e identificação de cadáveres, entre outros (BORÉM *et al.*, 2001).

As impressões digitais podem ser alteradas por cirurgias, o DNA de uma pessoa não pode ser alterado (BORÉM *et al.*, 2001).

Existem casos em que a mesma pessoa nasce com dois perfis diferentes de DNA, e não há como confirmar. É raro, mas a ciência já diagnosticou a existência de pessoas portadoras de dois perfis de DNA, um diferente do outro. O fenômeno causa dificuldades na solução de crimes, pois a exclusão ou a confirmação do envolvimento de um suspeito em casos de homicídios, estupros, identificação de ossadas e testes de paternidade fica prejudicada, já que o sangue do indivíduo pode apresentar um DNA diferente da amostra coletada em um dos tecidos do organismo do suspeito (MUG, 2006).

Durante a gestação, gêmeos não idênticos podem se fundir no útero, formando um único embrião a partir de dois óvulos e dois espermatozoides com carga genética distinta, e originar um indivíduo com dois tipos de células diferentes. O fenômeno é chamado de quimerismo, o termo quimera vem do grego e designava uma criatura mítica, parte leão, parte serpente e parte bode (MUG, 2006).

Obtenção do perfil do DNA.

O padrão de fragmento do DNA ou perfil de DNA de uma pessoa pode ser obtido pela análise do seu material genético.

O procedimento inclui sete etapas: Coleta da amostra; Isolamento do DNA; Corte do DNA; Separação dos Fragmentos; Transferência do DNA; Hibridização de sondas; e Perfil do DNA.

* Coleta da amostra: sangue, saliva, sêmen, pêlo, dente, ossos ou qualquer outro tecido ou fluido do indivíduo (BORÉM *et al.*, 2001).

Segundo BUDOWLE (1996), a qualidade, exatidão e confiabilidade dos resultados obtidos na análise de DNA, em vestígios coletados ou relacionados a ocorrências criminais, dependem de procedimentos próprios, que devem ser rigorosamente adotados nas etapas do isolamento do local do delito e do levantamento das amostras biológicas a serem encaminhadas para a unidade orgânica responsável pela genotipagem forense, no âmbito da respectiva Instituição.

As evidências físicas sofrem com fatores ambientais (luz, elevadas temperaturas, reativos químicos, substâncias corrosivas, ataque enzimático, contaminação/degradação por microorganismos, com conseqüentes quebras e outras alterações da cadeia de polinucleotídeos) que modificam a composição e a estrutura normal de seu DNA. Essas evidências estão ainda sujeitas às mais diversas formas de contaminação por material genético exógeno, derivado de outros seres humanos que não necessariamente estão ligados à cadeia de eventos do ato delituoso em questão (BONACCORSO, 2004).

* Isolamento do DNA: O DNA deve ser extraído das células ou dos tecidos das amostras. Dependendo do método de análise utilizado, uma pequena quantidade da amostra pode ser suficiente, como, por exemplo, as células descamadas da epiderme da testa do indivíduo, depositadas em um boné por ele utilizado. Uma gotícula de saliva deixada em um telefone ou no selo de uma carta pode também conter DNA suficiente para as análises (BORÉM *et al.*, 2001).

* Corte do DNA: a etapa seguinte é a digestão ou fragmentação do DNA com uma enzima de restrição. As enzimas *Hind III*, *EcoR I*, entre outras, têm sido utilizadas para essa

finalidade. Após o DNA ser tratado com a enzima de restrição (Uma enzima que cliva a molécula de DNA em uma determinada seqüência curta de base), irá conter um grande número de fragmentos de diferentes tamanhos; (BORÉM *et al.*, 2001).

* Separação dos Fragmentos: os fragmentos de DNA são ordenados por tamanhos, utilizando-se a técnica da eletroforese (técnica em que diferentes moléculas são separadas com base na sua velocidade de migração em um campo elétrico). Esse procedimento consiste em submeter os fragmentos do DNA de um gel, a uma corrente elétrica. O gel utilizado é feito com agarose, substância extraída de algas marinhas. O gel de agarose possui uma consistência similar à da gelatina. O procedimento consiste em depositar os fragmentos de DNA em uma canaleta (um pequeno sulco) moldada na extremidade do gel próxima ao eletrodo negativo. Com a corrente elétrica, o DNA migrará dentro do gel na direção oposta, isto é, em direção ao eletrodo positivo. Os fragmentos menores de DNA migram mais rapidamente que os maiores, permitindo, separá-los por tamanho (BORÉM *et al.*, 2001).

* Transferência do DNA: após a separação dos fragmentos no gel, eles são transferidos do gel para uma membrana de náilon, por capilaridade. Uma vez fixados nessa membrana, os fragmentos podem ser manipulados para sua visualização (BORÉM *et al.*, 2001).

* Hibridização de sondas: a adição de sondas coloridas ou radioativas à membrana de náilon permite a visualização dos fragmentos, que possuem seqüências gênicas complementar à sonda. Cada sonda utilizada evidencia apenas alguns dos fragmentos presentes na membrana (BORÉM *et al.*, 2001).

* Perfil do DNA: o perfil final do DNA é constituído, após a hibridização, de diferentes sondas à membrana. O resultado é um padrão de bandeamento de diferentes tamanhos (BORÉM *et al.*, 2001).

EXAME COMPARATIVO DO DNA

O DNA pode ser extraído de uma pequena amostra de qualquer material biológico, como sangue, cabelo, unha, sêmen, saliva, urina, entre outros. O exame de DNA dá-se de forma comparativa, ou seja, de cada uma das amostras são selecionados trechos significativos do DNA (locus).

No mínimo, 13 loci são analisados verificando-se o comprimento das seqüências das bases do DNA (alelos). A partir disso, são gerados perfis de DNA que são comparados entre si. A relação entre os alelos é que vai mostrar se existe vínculo genético familiar ou não. Depois, são realizados cálculos estatísticos para estimar o número de vezes em que esse perfil ocorre na população. A possibilidade de que duas pessoas tenham as mesmas seqüências dos trechos de DNA é estimada em uma em seis bilhões (GUERRA, 2007).

BANCO DE DADOS CRIMINAL

É usado para fazer comparação dos perfis genéticos obtidos de suspeitos com os cadastrados no banco e identificação de criminosos a partir de outros crimes. A tecnologia em questão pode ser usada para provar a inocência ou culpa de suspeitos, identificar restos mortais e amostras biológicas.

Usa-se o Sistema CODIS (*Combined DNA Index System*) do FBI / EUA (todo o país), que preconiza no mínimo 13 regiões de STR (SILVA & PASSOS, 2006). As 13 regiões são: D3S1358, VWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, CSF1PO, TPOX, TH01 e D16S539 (GRATTAPAGLIA *et al.*, 2001).

CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Conclui-se, que houve nos últimos anos, um grande crescimento da área forense no Brasil e novas técnicas são empregadas nos laboratórios, que já se encontram com equipamentos de primeiro mundo.

Apontada como a maior revolução científica na esfera forense desde o reconhecimento das impressões digitais como uma característica pessoal, as técnicas de identificação fundamentada na análise do DNA, ostentam duas vantagens sobre os métodos convencionais de identificação: a estabilidade química do DNA, mesmo após longo período de tempo, e a sua ocorrência em todas as células nucleadas do organismo humano, o que permite condenar ou absolver um suspeito com uma única gota de sangue ou através de um único fio de cabelo encontrado na cena do crime.

O estudo do DNA e seu emprego na área forense auxiliam muito na apuração de paternidade, quando já é falecido o suposto pai. As amostras mais freqüentes nos laboratórios, para realização de perícias, são, pela ordem, o sangue (líquido ou sob a forma de mancha seca), o sêmen (colhido no exsudato vaginal, peças íntimas ou manchas), os pêlos (no qual o DNA está concentrado na raiz) e os objetos com saliva (a saliva não contém células, mas nela podem ser encontradas células epiteliais da cavidade bucal, as quais possuem DNA); restos cadavéricos, amostra de músculos, ossos e polpa dentária. Considerando que a análise de DNA é uma técnica poderosa de identificação, ela deve ser utilizada de forma correta. O nível de sensibilidade de alguns dos procedimentos de identificação por DNA é tão alto que as células das mãos de quem manipulam as amostras ou aqueles presentes em um espirro podem contaminar as evidências criminais que contenham material genético. Dessa forma, o cuidado na coleta, custódia e manipulações da amostra são determinantes para a validade das análises. Portanto é importante a utilização de luvas descartáveis, além de máscaras e gorros cirúrgicos quando da coleta e processamento das evidências. Os procedimentos de coleta e as análises iniciais deverão ser padronizados, através de manuais de coletas.

Os laboratórios que prestam esse tipo de serviço devem ser submetidos a testes, para assegurar que eles estejam trabalhando com um controle de qualidade aceitável, uma vez que está em jogo a liberdade de um inocente e a sentença para o autor do delito.

As informações de caráter técnico não são completamente entendidas por uma parcela dos profissionais da lei. É muito difícil estabelecer um paralelo com outras ferramentas científicas empregadas pela justiça, já que nenhuma se compara à investigação genética no tocante ao seu alto poder de discriminação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMABIS, J. M. & MARTHO, G. R. Identificando pessoas pelo DNA: Uma simulação. Folha de São Paulo. Disponível em: http://www.fenixonline.com.br/ensino_medio/ivaneia/identificando_pessoas_dna.pdf. Acesso em: 15 mai. 2007.

BALAZS, I.; “Population genetics of 14 ethnic groups using phenotypic data from VNTR loci.” *in* DNA Fingerprinting State of the Science. S. D. Pena, *et al.*, 1993, p. 194-210.

BEZERRA, Carlos César. Exame de DNA: Técnicas de coleta em locais de crimes. Revista Perícia Federal, Brasília-DF, nº18. p. 7-14, jun./out. 2004.

BONACCORSO, N. ANÁLISE FORENSE DE DNA. Monografia apresentada em 2000 no Concurso de Ingresso para Professor da ACADEPOL e atualizada em 2004.

BORÉM, Aluizio; FERRAZ, Daniel Amin; SANTOS, Fabrício R. DNA e Direito. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília-DF, nº 22 p.42-44, set/out. 2001.

BRUCE, A., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RASS, M., ROBERTS, K & WALTER, P. Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.

BUDOWLE, B. Curso prático de DNA forense. Academia de Polícia do Distrito Federal – APC/DF. Brasília, Associação Brasileira de Criminalística – ABC, 1996.

CARRAPA, A *et al.*, Técnicas de análise de DNA aplicadas a diagnóstico. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Departamento de Biologia Celular e Molecular. Porto, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.medicina.med.up.pt>>. Acesso em: 13 mai. 2007.

DUARTE, F. A. M. CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA, Comitê sobre Tecnologia do DNA como Prova Forense. Funpec RP, 1999.

DUARTE, F. A. M. CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA, Comitê sobre A Avaliação do DNA como Prova Forense. Funpec RP, 2001.

GRATTAPAGLIA, D *et al.* Brazilian population database for 13 STR loci of the AmpF/STR® Profiler Plus™ and Cofiler™ multiplex Kits. Forensic Science International – Elsevier. São Paulo, 2001.

GUERRA, R. Crime sem corpo. Revista Ciência Criminal, São Paulo-SP, Ano 1; Nº. 8; p.22-24, abr. 2007.

HOCHMEISTER, M.; “PCR analysis of DNA from fresh and decomposed bodies and skeletal remains in medico legal death investigations.” *In*: Forensic DNA Profiling Protocols, Lincoln P. Editors, Humana Press, 1998, p. 19-26.

JEFFREYS, A. J.; Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. Biochemical Society Transaction, 1987, p. 309-317.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; NEUMANN, R.; KEYTE, J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction towards DNA fingerprinting of single cells. Nucleic Acids Res., v. 16, p. 10953-71, 1988.

Jobim, L; F.; JOBIM M. R.; BRENNER, C. Identificação Humana pelo DNA: Investigação de Paternidade e Análise de Casos Forenses. *in*: Identificação humana volume I, Tochetto, D. – coord., Porto Alegre: Sagra Luzzato, 1999. Parte IV, p. 237 – 303.

Jobim, Luiz *et al.* Identificação Humana pelo DNA in: Identificação humana volume II, Tochetto, D. –coord., Campinas/SP:Millennium, 2006. Parte I p. 7-97.

LEE H. C.; GAENSSLEN, R. E., eds. DNA and Other Polymorphisms in Forensic Science. St. Louis, Mosby Yearbook, 1990. p.76, 114-34 (Advances in forensic sciences, v.3)

LEITE, Fábio *et al.* DNA Forense: Exames de DNA Humano. in: Criminalística – procedimentos e metodologias, Tocchetto, D. – coord., Porto Alegre: Cleuza dos Santos Novakc, 1 edição: 2005. Capítulo XIII, P.242 – 243.

LIMA, L. O. Direito Médico - Utilização de Polimorfismo em Análises Forenses. Edição:2006. Disponível em: <http://www.geneticaffcmpa.fch.br>. Acesso em: mar. 2007.

MALACINSKEI, George M. Fundamentos da Biologia Molecular. cidade: Guanabara Koogan, 2005.

MUG, M. O desafio dos casos em que a mesma pessoa nasce com dois perfis diferentes de DNA, e não há como confirmar ou negar sua culpa em crimes que dependem dessa prova. Revista Ciência Criminal, São Paulo-SP Nº 2. Ed. Seguimento 2006.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F.A.; Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.*, 1987, p. 335-350.

PARADELA, R. E; FIGUEIREDO, S. L. Artigos » Direito Médico. O DNA vai ao tribunal: o impacto das tipagens genéticas. Artigos » Direito Médico. Escritório On-line, 2006. Disponível em: www.dnaforense.com. Acessado em: 16 mai. 2007.

PENA, S. D. J. O DNA como (única) testemunha em determinação de paternidade. *Bioética* v.5, 231-241, 1997

SILVA, Luis Antonio Ferreira; PASSOS, Nicolas Soares. DNA Forense - Coleta de Amostras Biológicas em Locais de Crimes para Estudo do DNA. Maceió: UFAL, 2006. 84p.

Zaha, A. Biologia Molecular Básica. 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

Recebido em / Received: Agosto de 2007

Aceito em/ Accepted: Novembro de 2007