

MARCADORES MOLECULARES: UM ENFOQUE FORENSE

José Ribeiro da Silva Júnior¹
Victor Edgard Tavares Sousa²

¹ Técnico em Patologia Clínica e Licenciado em Ciências Biológicas pela Faculdade Anhanguera. Aluno da pós-graduação em Biociências Forenses pela Universidade Católica de Goiás/IFAR.

² Orientador: Mestre em Biologia Molecular; Especialista em Licenciamento Ambiental; Biólogo Especialista em Saúde do Governo do Distrito Federal; Embriologista do Centro de Ensino e Pesquisa em Reprodução Assistida do Hospital Materno Infantil de Brasília. Professor da Faculdade LS e do Professor colaborador IFAR/PUC-GO.

RESUMO

Atualmente, com o avanço da tecnologia e de pesquisas, os marcadores moleculares ganharam notoriedade no âmbito judicial, seja para elucidação de um crime ou para estabelecer a relação de parentesco entre pessoas. A identificação humana por DNA se tornou um dos métodos mais utilizados. Sua alta especificidade e confiabilidade são características imprescindíveis, e apresenta poucas desvantagens, desde que os procedimentos sejam corretamente realizados. Portanto, torna-se possível estabelecer relação entre um acusado e uma cena de crime, assim como a relação de paternidade entre o suposto pai e filho. O que tornou os processos judiciais mais ágeis e eficazes.

Palavras - chave: Marcadores moleculares, DNA, polimorfismo, STR e VNTR, identificação humana.

ABSTRACT

Currently, with the advancement of technology and research, molecular markers have gained notoriety under judicial processes, whether for elucidation of a crime or to establish the relation between people. Human identification by DNA became one of the most used methods. Its high specificity and reliability are indispensable features, and presents few drawbacks, since the procedures are properly carried out. Therefore, it becomes possible to establish relationship between a defendant and a crime scene, as well as the relationship of paternity between the alleged father and son. This made the judicial processes more agile and effective.

Keywords: Molecular markers, DNA, polymorphism, VNTR and STR, human identification.

1. INTRODUÇÃO

As Ciências Forenses perfazem especialidades que têm como objetivo auxiliar juízes e júris a resolver questões legais, não só no direito penal, mas também em casos cíveis. Tal campo de atuação apresenta-se de modo abrangente, cruzando os limites entre a biologia, química, física e matemática e incluindo disciplinas tão variadas como botânica e balística, e a análise das impressões digitais.

Nos últimos 30 anos, uma ferramenta biológica tem revolucionado as investigações forenses: a análise de DNA. Como todo o DNA é extremamente variável entre os diferentes seres, até mesmo entre indivíduos da mesma espécie, qualquer material biológico associado a uma investigação pericial, carrega consigo informações sobre sua origem (JOBILING, 2004).

A molécula de DNA caracteriza-se como uma importante ferramenta para as ciências forenses, porquanto através desta pode-se determinar a identidade genética de um indivíduo. Possui estrutura tridimensional em formato de dupla hélice devido à disposição antiparalela das suas cadeias de nucleotídeos, e é responsável pela transmissão das informações genéticas através das gerações (QUEIROZ, 2012).

Em algumas de suas regiões existem sequências hipervariáveis que podem ser utilizadas para diferenciar indivíduos e estabelecer vínculo genético, devido ao fato de serem altamente polimórficas. Tal característica corrobora a premissa de que o patrimônio genético de cada pessoa é único, excetuando-se os gêmeos monozigóticos. Anteriormente, outras ferramentas eram empregadas para as investigações forenses, como os sistemas ABO e HLA, porém estes não apresentam poder de discriminação comparável à identificação humana por DNA (PARADELA *et al.*, 2006).

Tais variações em sequência podem ser manifestadas em regiões de alelos alternativos ou substituições, adições ou deleções de bases, mas, em geral, originam-se de mutações. Já foram identificados e mapeados mais de dez milhões de polimorfismos no

genoma humano, que podem ser estudados em produtos de amplificação cada vez mais curtos, o que os tornam mais vantajosos em análises forenses (PENA, 2005).

De acordo com Silva e Passos (2006), o estudo do DNA é a técnica de identificação humana mais importante desde a descoberta das impressões digitais. Para tanto, a coleta e preservação das amostras biológicas de forma adequada são imprescindíveis para a realização dos exames periciais, o que contribui significativamente para a resolução de crimes e identificação de indivíduos.

Além dos autossomos, o Cromossomo sexual Y (crY) também apresenta regiões com sequências polimórficas que, por não sofrerem recombinação, ou esta ser reduzida, costumam ser transmitidas, intactas, para a geração seguinte. Tal heterossomo é comumente analisado quando se deseja investigar a linhagem parental de um indivíduo ou uma população (LIMA 2006).

Ressalta-se também a importância do DNA mitocondrial (mtDNA) no contexto forense, por apresentar estrutura circular e estar presente no interior das mitocôndrias, organelas responsáveis pela respiração celular. Tal molécula caracteriza-se por seu elevado número de cópias por organela e apresenta considerável estabilidade em virtude de seu tamanho reduzido e de sua estrutura circular. O mtDNA pode ser extraído de qualquer tecido ou fluido biológico, desde que possua componentes células, como por exemplo, ossadas antigas com elevado grau de degradação do material genético impossibilitando a obtenção de DNA nuclear, e em fios de cabelo que não possuem mais o bulbo (SILVA; PASSOS, 2006).

Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, expresso ou não, (FERREIRA; GRATTAPAGLIA 1998). Portanto, são de grande importância na área forense, pois por meio destes é possível se obter excelentes resultados em investigações de paternidade e parentesco, investigação criminal e identificação de indivíduos. O presente trabalho tem por objetivo apresentar uma visão geral do campo da genética molecular forense e, de

forma detalhada, ressaltar a importância das ferramentas moleculares na identificação legal.

2. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão bibliográfica, baseada em livros e trabalhos científicos que tratam do referido tema. As pesquisas foram realizadas por meio de acesso a *internet* em *sites* como Google Acadêmico, Scielo, PubMed e publicações disponíveis em sites de Universidades. Também serão fontes de informação livros, teses, monografias e dissertações disponíveis na biblioteca da Universidade Católica de Brasília.

3. DISCUSSÃO

3.1. A MOLÉCULA DE DNA NO CONTEXTO FORENSE

Todos os seres vivos possuem um número quase inimaginável de células distintas que trabalham em cooperação a fim de produzir um indivíduo único e singular (MEYER, 2005). Com exceção de alguns tipos de vírus, nos quais o material genético é o ácido ribonucleico (RNA), todos os demais seres, como os humanos, animais e vegetais, possuem o ácido desoxirribonucleico (DNA) como base do material genético. Este é encontrado no núcleo das células e organizado na forma de cromossomos, cada cromossomo é formado por uma única molécula de DNA que possuem vários milhões de pares de base (SILVA; PASSOS, 2006).

As moléculas de DNA apresentam uma enorme resistência a diversas condições capazes de destruir a maioria dos compostos biológicos como os lipídeos, proteínas e carboidratos. É transmitido pelos progenitores e determina ou influencia muitos aspectos da aparência, do comportamento e do funcionamento do organismo. Um grande número de unidades chamadas genes é encontrado em cada filamento de DNA e cada gene é utilizado para determinar uma característica em particular ou parte de uma característica.

Isso significa ser possível encontrar cópias do DNA de um indivíduo em praticamente todo tipo de tecido do corpo (MEYER, 2005).

Segundo Griffiths e colaboradores (2001), um gene é uma seção de um DNA que pode apresentar variações denominadas alelos, e de acordo com as diferenças alélicas, a presença de duas ou mais variantes comuns em um grupo ou população é definida como polimorfismo. Para haver o polimorfismo, a região do cromossomo no qual se encontram sequências de DNA (locus) deve conter dois ou mais alelos que com uma frequência maior que 1% na população.

O polimorfismo possui uma imensa importância na criminalística, visto que permite identificar uma pessoa em função do seu padrão de alelos (QUEIROZ, 2012). Conforme Dolinsky e Pereira(2007), os polimorfismos de comprimento e polimorfismos de sequência são assim agrupados de acordo com suas presenças nas regiões hipervariáveis do DNA. Os polimorfismos encontrados nas regiões hipervariáveis do DNA podem ser classificados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos principais polimorfismos encontrados em regiões hipervariáveis do DNA. (FIGUEIREDO; PARADELA, 2007, com adaptações).

Polimorfismo	Descrição
Polimorfismos de Comprimento	VNTR ou minissatélites (<i>Variable Number of Tandem Repeat</i>) STR ou microssatélites (<i>Short Tandem Repeat</i>)
Polimorfismos de Sequência	SNP (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)

Na identificação genética por DNA são estudadas regiões genômicas em que há variação entre pessoas normais, os chamados polimorfismos de DNA ou marcadores de

DNA. Os VNTR (minissatélites) e STR (microsatélites) são as regiões repetitivas de maior importância estudadas atualmente, pois podem ser detectadas tanto por meio de sondas de DNA quanto por reação em cadeia de polimerase (PCR). Entretanto, os SNP's e os polimorfismos de inserção/deleção (indels) de um ou mais nucleotídeos podem se tornar grandes aliados devido ao fato de que podem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos, 50 pares de base ou menos, apresentando enorme vantagem em relação aos microsatélites no estudo de DNA extremamente degradados (PENA, 2005).

O uso da tipagem de DNA nos últimos anos abriu espaço para novas áreas de estudos e se tornou uma importante ferramenta nas análises forenses promovendo a elucidação de crimes, o que trouxe uma enorme vantagem para as ciências forenses e para a justiça, (BONACCORSO, 2005).

3.2. MARCADORES MOLECULARES

A evolução da genética forense foi impulsionada pelas análises das variações genéticas humanas, iniciadas com a descoberta dos polimorfismos do grupo sanguíneo ABO por Karl Landsteiner em 1900. Ressalta-se que mesmo o simples sistema genético ABO pode ser utilizado para demonstrar, conclusivamente, que uma determinada amostra não é originária de determinado indivíduo, atuando, portanto, como uma prova de exclusão. Entretanto, o DNA apresenta vantagem em relação aos métodos mais antigos como os que utilizavam enzimas e grupos sanguíneos que precisavam de grandes quantidades de material biológico, pois para a identificação de um indivíduo são necessárias poucas células nucleadas com pequenas quantidades de DNA (DUARTE et al., 2001).

Todavia, o grau de dificuldade aumenta à medida que se procura identificar a origem de determinada amostra biológica. Com isso, o conceito dos marcadores moleculares vem sendo utilizado para se caracterizar o DNA de um indivíduo em um padrão ou perfil de fragmentos que lhe é exclusivo. Diferentemente das impressões

digitais, que podem ser alteradas por cirurgia, o DNA de uma pessoa não pode ser deliberadamente modificado (BORÉM et al., 2001).

3.2.1. Minissatélites (VNTR's).

A revolução das análises de DNA começou com a descoberta, em 1984, dos loci hipervariáveis conhecidos como minissatélites. Estes foram detectados por meio de hibridização de sondas em Southern blot a partir da digestão de DNA genômico por enzimas de restrição (VELHO et al., 2013).

Conforme Góes (2008), regiões denominadas minissatélites ou repetições em tandem de número variável (VNTR, do inglês variable number of tandem repeats) compõem uma fração de DNA repetido, e o primeiro método de sua detecção foi denominado RFLP (do inglês, restriction fragment length polymorphism) ou polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição. Tais regiões possuem grande variabilidade e constituem-se de 09 a 1000 pares de bases repetidos em loci cromossômicos de forma sequenciada, em tandem, usualmente ricas em GC. Com exceção dos gêmeos homozigóticos, a existência de duas pessoas com o mesmo perfil genético é praticamente impossível devido à alta variabilidade destas regiões do genoma.

Em 1985, Alec Jeffreys e seus colaboradores cunharam o termo Impressão Digital de DNA (DNA fingerprinting), e foi assim chamada por ser uma técnica capaz de diferenciar geneticamente cada pessoa, fazendo alusão à capacidade de diferenciação dos indivíduos através das impressões digitais (VELHO et al., 2013). Assim, como no auxílio do mapeamento do genoma humano, as primeiras sequências VNTR descritas tiveram aplicação imediata na área forense (GÓES, 2008).

Tal técnica é a mais antiga desenvolvida para identificação humana, e já foi muito utilizada no passado. Entretanto, vem sendo substituída por tecnologias mais recentes e sofisticadas como os microssatélites. Por ser uma técnica extremamente trabalhosa e que

se utilize de material radioativo, esta foi deixada de lado mesmo apesar de seu custo relativamente baixo.

Atualmente a análise de regiões VNTR do DNA é pouco utilizada em investigações genéticas, devido ao fato de necessitar de DNA íntegro e em grande quantidade, o que torna praticamente inviável a análise de amostras biológicas degradadas ou antigas (LIMA, 2006).

3.2.2. Microssatélites (STR's).

As sequências curtas repetidas em tandem, ou STR's, ou ainda microssatélites, possuem geralmente um tamanho de dois a dez pares de bases e se localizam em regiões não codificantes do genoma. Aproximadamente 30% das regiões repetitivas do genoma são formadas por esses microssatélites e a maioria são repetições de dois a seis nucleotídeos. Entretanto aquelas mais utilizadas na identificação humana são as de quatro a cinco nucleotídeos, que ocorrem numa região específica do genoma num locus único (VELHO et al., 2013).

Devido o seu tamanho reduzido, os microssatélites podem ser analisados após amplificação pela técnica PCR. Tal característica permite que amostras com pequenas quantidades de DNA, ou com alto grau de degradação, possam ser tipadas. Desta maneira, a possibilidade de realizar análise de loci STR superou várias limitações pertinentes à manipulação de seqüências VNTR, o que tornou a tipagem de marcadores STR o método mais utilizado na identificação por DNA utilizando-se os vestígios biológicos em geral (GÓES, 2008).

Tais marcadores são altamente individualísticos e a análise de 13 regiões do genoma humano, com os kits comerciais disponíveis no mercado, permite a emissão de laudos que estabelecem uma probabilidade de 1 em 82 bilhões de distinguir dois indivíduos (BORÉM et al., 2001).

A análise de STR's tornou ultrapassadas as primeiras técnicas de PCR em virtude de seu alto poder de discriminação e sensibilidade. Além disso, o tempo necessário para realização foi drasticamente reduzido, assim como seus custos, em virtude da automação. Microssatélites são mais sensíveis do que outros métodos e permitem uma inequívoca atribuição de alelos, tornando o método adequado para o desenvolvimento de bancos de dados. Com isso, abriu-se caminho para o desenvolvimento de Bancos de Dados de STR DNA (VELHO et al., 2013).

3.2.3. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP).

Segundo Velho e colaboradores (2013), os SNPs são variações de um único nucleotídeo em uma determinada posição da sequência de DNA quando diferentes alelos de um mesmo indivíduo são comparados, ou quando os alelos analisados em uma população específica são comparados. São geralmente bialélicos, apresentando dois alelos para cada loco analisado, e são usualmente resultado de mutação do tipo transcrição e por apresentarem menos variação, fornecem menos informações que os STRs.

A vantagem prática na utilização de SNP's está no fato do tamanho do DNA *template*, que pode, em teoria, ter comprimento de aproximadamente 50 pares de base, ou um par de *primers* específicos. Tamanho inferior aos aproximados 300 pares de bases necessários para utilização de algumas STR. Com isso, torna-se viável a utilização de SNP's em análises de material biológico severamente degradado (VELHO et al., 2013).

Os SNP têm grande potencial como marcos na análise de mapeamento. Nos humanos acredita-se que existam três milhões de SNP distribuídos mais ou menos aleatoriamente, com uma frequência de 01 em cada 300 a 1.000 bases, o que proporciona um conjunto útil de marcadores para mapeamento em escala fina (GRIFFITHS et al., 2008).

3.2.4. Cromossomo Y (crY)

Diferentemente do mtDNA o cromossomo Y (crY) apresenta herança paterna, sendo transmitido apenas aos filhos homens. Apesar de não fornecer informações específicas de cada indivíduo, as análises das STR's fornecem informações importantes quanto à origem parental (DOLINSKY; PEREIRA, 2007). Sendo assim, o estudo desses marcadores do DNA do cromossomo Y identifica um padrão que se estende por muitas gerações, por até mais de 500 anos. Dessa forma, um indivíduo masculino possui um padrão de cromossomo Y praticamente idêntico a todos os seus ascendentes e descendentes.

Os STR's autossômicos têm sua variabilidade originada de três processos: rearranjo cromossômico independente, recombinação e mutação. Entretanto, a variabilidade dos microssatélites do cromossomo Y é resultado exclusivo de eventos mutacionais, o que torna significativo na análise forense do DNA, pois neste caso, não ocorre recombinação durante a meiose devido à falta de um cromossomo homólogo, dessa forma só é possível identificar alelos de origem masculina. Portanto, explica-se o porquê da conservação estar diretamente relacionada à relativamente baixa taxa de recombinações no cromossomo Y (JOBIM, 2003).

A análise destes microssatélites tem sido muito utilizada para desvendar casos de estupro e para realizar testes de paternidade quando não há a presença da mãe (JOBIM *et al.*, 2006; LIMA, 2006).

Conforme Paradela e Figueiredo (2007) vale ressaltar que a necessidade de se identificar tanto a origem materna quanto a paterna não se dá somente por razões financeiras ou sociais, mas também por questões de saúde, como em caso da necessidade de transplantes e de doenças de difícil diagnóstico e tratamento.

3.2.5. DNA Mitocondrial (mtDNA).

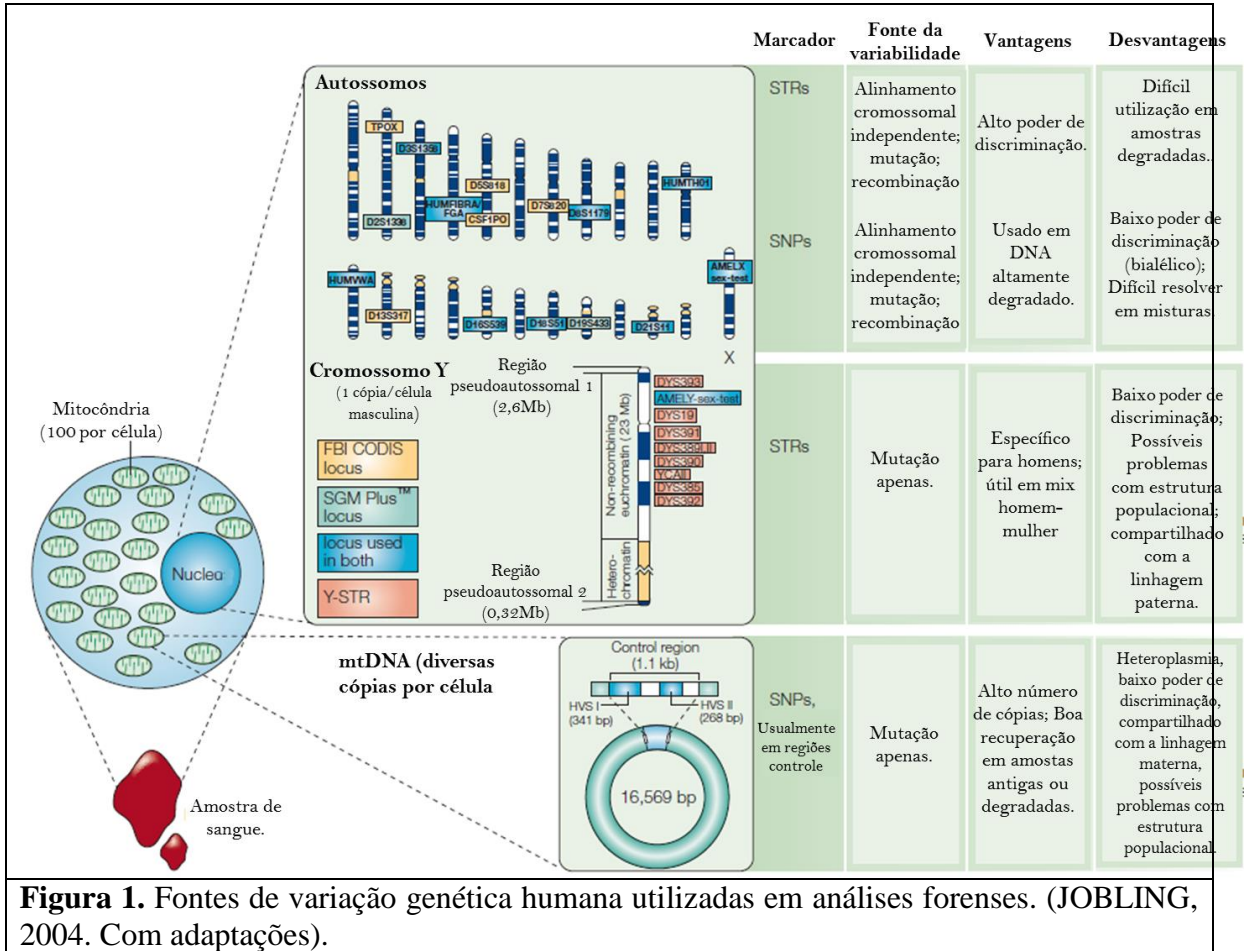
Nos estudos rotineiros de identificação humana apenas o DNA nuclear é estudado (SILVA; PASSOS 2006). Porém, além deste, há um tipo específico que está localizado no citoplasma, especificamente no interior das organelas especializadas na produção de energia, as mitocôndrias: o DNA mitocondrial (mtDNA). Por ser de origem materna, herdado pelo gameta feminino, não fornece informações de origem paterna, porém relações familiares de origem materna são reconhecidas facilmente. É uma técnica muito eficiente na realização de testes de maternidade em que não se tenha conhecimento do pai (JOBIM *et al.*, 2006). A região *D-loop* ou região controle, do genoma mitocondrial, é hipervariável e importante na identificação de indivíduos, já que contém o sinal que controla a síntese de DNA e RNA (FARAH, 2007).

O fato de o DNA mitocondrial não sofrer recombinação, não segregar de forma independente, ser de herança exclusiva materna, apresentar heteroplasmia (presença de mais de uma sequência de DNA mitocondrial na mesma célula ou indivíduo) confere algumas das desvantagens também relacionadas ao cromossomo Y. Entretanto, sua importância repousa sobre o seu número de cópias o que resulta em maior probabilidade de sua recuperação quando comparada a do DNA cromossomal (JOBLING, 2004).

Em situações em que o DNA cromossomal se encontra em quantidades muito pequenas ou até mesmo ausentes devido a degradação, é utilizado o mtDNA, porque mesmo em amostras obtidas em péssimas condições, a probabilidade de existir mtDNA suficiente para a análise de PCR é muito grande devido às células apresentarem centenas ou milhares de mitocôndrias (FARAH, 2007).

Uma única célula possui mais de 5.000 cópias de mtDNA, o que o torna um marcador de grande interesse forense sendo utilizado principalmente em ossos antigos, amostras de fios de cabelo que não possuem mais bulbo e em explosões, incêndios e grandes desastres, pois devido a dificuldade de se identificar os corpos é possível se fazer uma comparação com possíveis ascendentes maternos (JOBIM *et al.*, 2006). É comum o

sequenciamento de regiões altamente polimórficas situadas na chamada região controle, assim como no uso de SNP's fora destas regiões. A Figura 1 demonstra as fontes de variação genética utilizadas na análise e prática forense molecular.



4. TÉCNICAS DE ANÁLISE DO DNA

4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A análise de DNA evoluiu para tornar-se uma parte indispensável da rotina de trabalho das ciências forenses modernas, empregando técnicas extremamente sensíveis

para analisar material biológico, baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase, ou PCR (PENA, 2005).

Desenvolvida por Kary e Mullis na década de 80 a técnica de PCR trata-se de uma metodologia *in vitro* que possibilita a reprodução de milhares de cópias de um determinado fragmento de DNA. Tornou-se uma das técnicas mais empregadas em diversas áreas do diagnóstico molecular, iniciando uma revolução tecnológica e possibilitando a análise do genoma por meio de métodos automatizados (MOLINA; TOBO, 2004).

A amplificação de DNA por PCR fornece um aumento de sensibilidade, permitindo analisar quantidades mínimas de DNA, mesmo degradado e, atualmente, constitui a base de toda genética forense. Sua extrema sensibilidade torna possível trabalhar com amostras em pequenas quantidades e ainda se obter uma *impressão digital de DNA* da pessoa da qual a amostra proveio (ALBERTS *et al.*, 2006). Assim, a determinação da identidade genética pelo DNA em situações anteriormente impossíveis como fragmentos de unhas, saliva depositada em filtros de cigarros e fios de cabelo sem bulbo se tornaram possíveis (PENA, 2005).

Para a realização da PCR, utiliza-se uma DNA polimerase termoestável que, na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e dos quatro nucleotídeos-trifosfato que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. Esta amplificação ocorre em ciclos, com repetidas variações de temperatura e duração de cada etapa, que permitem a desnaturação da dupla-fita de DNA, a hibridização dos oligonucleotídeos às seqüências-alvo, e para a atividade ótima da enzima na síntese de novas cadeias de DNA. O desenvolvimento de equipamentos específicos, os termocicladores, permitiu maior grau de automação ao processo de PCR (MOLINA; TOBO, 2004).

Uma das limitações da técnica de PCR é a contaminação do DNA. Se tal contaminante estiver presente em níveis elevados, poderá induzir uma conclusão

equivocada, pois a amplificação poderá gerar fragmentos de DNA capazes de confundir a interpretação dos resultados da tipagem (DUARTE et al., 2001). Por isso a necessidade de cuidados especiais no laboratório (PENA, 2005).

Segundo Smarra e colaboradores (2006), padrões rígidos devem ser executados para todas as etapas da análise da DNA, partindo da coleta, a manutenção da cadeia de custódia, a análise laboratorial e a interpretação dos resultados, a fim de se evitar erros e garantir a confiabilidade dos testes.

4.2. Eletroforese

Métodos eletroforéticos são técnicas rápidas, precisas e sensíveis, que possuem pouca dificuldade de realização, o que as tornam muito versáteis. Durante a década de 1980, os métodos eletroforéticos sorológicos e de proteínas foram amplamente utilizados para acessar a diversidade de grupos sanguíneos e os polimorfismos de proteínas. Entretanto, a degradação acelerada e o comprometimento em virtude da atuação de enzimas bacterianas, ressaltavam as desvantagens de tais marcadores. Ademais, a relativa baixa variabilidade também afetava negativamente suas utilizações.

A utilização de moléculas de DNA como marcadores é, atualmente, amplamente aceita. Após a realização da técnica de PCR, o DNA amplificado é separado e visualizado através do padrão diferencial de sua migração em géis, de agarose ou acrilamida. As diferentes velocidades de migração são resultado da ação de uma corrente elétrica, promovendo a separação e identificação dos fragmentos de DNA de acordo com sua forma e tamanho (VIEIRA, 2006).

Com isso, torna-se possível estabelecer o tamanho absoluto de cada fragmento no *pool*, após ser comparado a sua distância de migração em relação a um conjunto de fragmentos padrão de tamanhos conhecidos, e realizar a separação e a purificação do DNA na matriz do gel. Quando se deseja observar os tamanhos e quantidades relativas de fragmentos de DNA presentes, denominamos eletroforese diagnóstica e, quando se

almeja isolar fragmentos específicos de DNA, eletroforese preparativa (GRIFFITHS *et al.*, 2008).

4.3. Southern blot

De acordo com Voet e colaboradores (2002), após a clivagem do DNA com uma enzima de restrição, ocorrerá produção de uma mistura de fragmentos. Por meio da técnica de Southern blot um único fragmento de restrição específico pode ser detectado por mais complexo que esta mistura seja, já que tal técnica utiliza a capacidade da membrana de nitrocelulose em ligar-se fortemente ao DNA fita simples.

Para que seja realizada com sucesso, é essencial o uso de DNA genômico total e este esteja com as moléculas intactas (DUARTE *et al.*, 2001). A técnica se inicia com a realização de uma eletroforese com este DNA, em seguida o gel é embebido em NaOH e o DNA fita dupla é convertido em DNA fita simples. O gel é então recoberto por uma folha de nitrocelulose. As moléculas são forçadas a se deslocar para a nitrocelulose por capilaridade e o DNA fita simples se liga na mesma posição em que estava no gel à membrana de nitrocelulose. A fixação do DNA ocorre após secagem a 80° C, a partir daí a membrana de nitrocelulose é umedecida com uma solução que contém uma sequência de DNA conhecida (sonda de DNA fita simples) e esta pode incluir uma região polimórfica para a discriminação de indivíduos (VOET *et al.*, 2002).

5. BANCO DE DADOS

Assumindo-se que suspeitos podem ser vinculados às cenas de crimes utilizando-se evidências de DNA contidas em saliva, bitucas de cigarro, células de epitélio e pelos, surge o importante papel dos Bancos de Dados de DNA.

O desenvolvimento de Bancos de Dados de DNA permitiu a comparação de perfis genéticos encontrados em cenas de crimes, fato que favorece correlacionar, ao menos

parcialmente, indivíduos à cena avaliada. Tais Bancos atuam como uma referência, um padrão, local onde se encontra um perfil genético de uma pessoa previamente identificada e com ele é realizada uma comparação com o perfil genético de um vestígio biológico encontrado na cena do crime (VELHO *et al.*, 2013). Essa tecnologia serve para identificar restos mortais, amostras biológicas, libertar inocentes e prender culpados (DOLINSKY; PEREIRA, 2007).

O primeiro país a implantar tal tecnologia em nível nacional foi o Reino Unido, em 1995. Em princípio, cadastravam-se apenas condenados por homicídio e estupro, porém, os ingleses perceberam que quanto mais pessoas estivessem cadastradas no banco mais fácil seria solucionar os crimes. A legislação inglesa foi aperfeiçoada e hoje praticamente qualquer pessoa detida pela polícia é identificada geneticamente (VELHO *et al.*, 2013).

Em 1998, os Estados Unidos lançaram seu banco nacional de perfis genéticos. O Sistema de Índice de DNA Combinado (CODIS – do inglês, *Combined Dna Index System*) desenvolvido pelo FBI e considerado o mais importante, pois permite que os perfis genéticos gerados em mais de 200 agências de investigação criminal independentes sejam comparados entre si (PENA, 2005; VELHO *et al.*, 2013).

Os avanços tecnológicos, especialmente na área de automação, permitiram o estabelecimento de Bancos de Dados que não apenas correlaciona uma amostra encontrada em cena de crime a um provável suspeito, mas também permite a comparação de perfis genéticos relativos às cenas criminais com aqueles armazenados nos bancos de dados. Assim, tornam-se possíveis investigações sobre novos suspeitos, baseadas na semelhança dos perfis analisados (VELHO *et al.*, 2013).

No Brasil, em consequência da falta de um banco de dados de perfil genético apenas se analisava os vestígios encontrados em uma minoria de locais de crimes, quando havia um suspeito e este concordava em fornecer amostra biológica. Mas esta situação começou a mudar com a aprovação da lei 12.654, de 28 de novembro de 2012 (VELHO *et al.*, 2013).

5.1. Legislação Brasileira

De acordo com a constituição federal de 88 (artigo 5º, inciso II), “ninguém será obrigado a fazer ou deixar de fazer alguma coisa senão em virtude da lei”. Esse direito individual prejudicava a realização de exames em casos criminais, pois na ausência de lei específica, a doação de material biológico pelos suspeitos só se dava de forma voluntaria e esse material doado de forma voluntaria não era inserido em banco de dados.

A Lei 12.654/2012 que modificou outras duas leis, inclusive a Lei de Execução Penal, definiu circunstâncias em que a identificação genética é compulsória.

Lei 12.037/2009 (Lei de Identificação Criminal) foi a primeira a ser modificada. Esta definia que a identificação criminal era feita apenas pela impressão digital e fotografia, porém com a nova redação segundo o artigo 5º parágrafo único:

Art. 5º. Se a identificação criminal for essencial às investigações policiais, segundo despacho da autoridade judiciária competente a identificação criminal poderá incluir a coleta de material biológico (DNA) para a obtenção do perfil genético.

Em seguida a Lei 7.210/1984 (Lei de Execução Penal) foi modificada, passando a determinar que todo condenado a crime hediondo ou violento contra a pessoa será identificado geneticamente.

Art. 9º Os condenados por crime praticado, dolosamente, com violência de natureza grave contra pessoa, ou por qualquer dos crimes previstos no art. 1º da Lei no 8.072, de 25 de julho de 1990, serão submetidos, obrigatoriamente, à identificação do perfil genético, mediante extração de DNA - ácido desoxirribonucleico, por técnica adequada e indolor. (Incluído pela Lei nº 12.654, de 2012)

§ 1º A identificação do perfil genético será armazenada em banco de dados sigiloso, conforme regulamento a ser expedido pelo Poder Executivo.

Segundo Velho e colaboradores (2013) se houver investimentos necessários, esses perfis genéticos adquiridos por meio dessa nova legislação e armazenados em bancos de dados contribuirão exponencialmente no combate aos altos índices de criminalidade e impunidade no Brasil.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação humana tem mostrado útil em diversas áreas, principalmente, em estudos forenses quando é necessária a correta identificação para que possa ser iniciada a investigação. Nos últimos anos, a ciência forense obteve, como aliado, os marcadores de DNA, incríveis ferramentas: permitem esclarecimentos na área cível, em investigações de paternidade; e na área criminal, em casos de violência sexual, análises de material encontrado em cenas de crimes, a identificação criminal de quem são os verdadeiros culpados e também eximir possíveis inocentes.

Normalmente são utilizados marcadores de DNA nuclear para identificação de indivíduos, uma vez que um número maior de sequências pode ser estudado, e apresentam um maior grau de confiança, entretanto o mtDNA e o crY que são transmitidos de geração para geração devem ser utilizados, como em casos de estupro e na investigação da linhagem parental de uma população ou mesmo de um indivíduo.

O desenvolvimento de técnicas cada vez mais sensíveis, o uso de novos marcadores, a qualificação técnica e o estabelecimento de rígidos padrões de análise desde a coleta até a interpretação dos resultados, permitirão maior agilidade e a confiabilidade da justiça nas investigações de paternidade, maternidade e solução de crimes.

A genética forense está intimamente relacionada ao desenvolvimento das técnicas de análises de DNA. Uma das grandes dificuldades ainda está na identificação de fluidos corporais. Técnicas de biologia molecular para análise e identificação de manchas de sangue, sêmen e saliva utilizando RNA's mensageiros (mRNA) específicos, surpreendentemente estáveis, tem sido descritos frequentemente na literatura e, provavelmente, serão foco de novos estudos e matérias primas para novas tecnologias (JUUSOLA,2003).

Os bancos de dados com informações genéticas são cada vez mais utilizados em todo o mundo, pois a identificação de investigados por DNA se torna viável devido ao material genético armazenado, facilitando assim as investigações com informações confiáveis e que possam ser utilizadas a favor ou contra em um caso.

Por fim, os marcadores moleculares se mostraram de grande importância para a justiça e se tornaram ferramentas indispensáveis na elucidação de crimes, pois os resultados de identificação genética pelo DNA são a forma mais confiável e segura para estabelecer relação entre o suspeito e a cena do crime. E graças ao desenvolvimento dessas tecnologias esses resultados se tornaram comumente aceitos por meio de processos judiciais em tribunais de todo o mundo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. et al.. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2ª Edição. Artmed. 2006. 350 p.
- BONACCORSO, N.S. **Aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes**. 193 p. Pós Graduação (mestrado). Faculdade de direito da universidade de São Paulo, 2005.
- BORÉM, A.; FERRAZ, D.A.; SANTOS, F. DNA e Direito. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 22, set-out. 2001.
- BRASIL. **Constituição da Republica Federativa do Brasil**. Artigo 5º, inciso II. 1988.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S.. **Técnicas básicas de biologia molecular**. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2004.

DOLINSKY, L.C.; PEREIRA, L.M.C.V. **DNA Forense. Saúde e ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.2, n.2, p.11-22, jul-dez. 2007.

DUARTE, F.; PEREZ, A. M.; PENA, Sergio. D.; de Barros, Margareth. P.M.; Rossi, Elsie O. **A avaliação do DNA como Prova Forense**. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2001.283 p.

FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. 2ª edição. São Paulo: Sarvier, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.

FIGUEIREDO, A. L. S. ; PARADELA, E. R. **O DNA vai ao tribunal: o impacto das tipagens genéticas**. In: Âmbito Jurídico, Rio Grande, X, n. 41, maio 2007. Disponível em: <http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=1790>. Acesso em: dez 2013.

GÓES, A. C.. **Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais**. Revista do Biomédico(65). Disponível em: <http://www.crbm1.com.br/bio65/artigocien_65.asp>. Acesso em: jan 2014.

GRIFFITHS, Antony J. F; GELBART, William M; MILLER, Jeffrey H; LEWONTIN, Richard C. **Genética Moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2001. 335 p.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROL, S. B. **Introdução à Genética**. Nona edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.123; p.618–619

JOBIM, L. F. **DNA & SEXO**. 2003. Disponível em: <<http://www.dnareference.com.br>>. Acesso em Janeiro, 2014.

JOBIM, L. F.; COSTA, L. R. S.; SILVA, M.. **Identificação humana pelo DNA in: Identificação Humana**. Volume II. Campinas: Millennium, 2006.p. 10-97.

JOBLING M. A.; GILL P. **Encoded evidence: DNA in forensic analysis**. Nat Rev Genet. 2004 Oct;5(10):739-51. Review. Erratum in: Nat Rev Genet. 2005 Mar;6(3):246.

JUUSOLA, J.; BALLANTYNE, J. **Messenger RNA profiling: a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification provides an insight into the potential of mRNA to analyse the type of body fluid in crime-scene samples**. Forensic Sci. Int. 135, 85–96 (2003).

LIMA, L.O. **Direito médico – Utilização de polimorfismo em Análises forenses**. Edição: 2006. Disponível em: <<http://www.geneticaffccmpa.fch.br>>. Acesso em: jan. 2014.

[LEI Nº 12.654, DE 28 DE MAIO DE 2012.](#)

[LEI Nº 12.037, DE 1º DE OUTUBRO DE 2009.](#)

LEI Nº 7.210, DE 11 DE JULHO DE 1984.

MEYERS, A. **Detetives do DNA – Como a dupla hélice esta solucionando mistérios e crimes do passado**. Rio de Janeiro: Record, 2005. p. 12-15.

MOLINA, A. L.; TOBO, P. R. **Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico**. *Einsten*, 2 (2): p. 139-142, 2004.

PARADELA, E. R.; FIGUEIREDO, A. L. S. **As tipagens por análise de DNA e a sociedade**. Portal da Associação de Magistrados Brasileiros (AMB), Disponível em <<http://www.amb.com.br>>. Acesso em janeiro 2014, v. 9, n. 04, 2007.

PARADELA, E. R.; FIGUEIREDO, A. L. S.; SMARRA, A. L. S. **A identificação humana por DNA: aplicações e limites**. In: *Âmbito Jurídico*, Rio Grande, IX, n. 30, jun 2006. Disponível em: <http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=1175&revista_caderno=6>. Acesso em dez 2013.

PENA, S. D. J. **Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA**. In: Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação. Parcerias Estratégicas, v. 20, p. 447–460. 2005.

QUEIROZ, Paulo R. M.. **Conceitos de DNA forense aplicados à identificação humana**. Curitiba: Appris, 2012. 63 p.

SILVA, L. A. F.; PASSOS, N. S. **DNA Forense – Coleta de Amostras Biológicas em Locais de Crimes para Estudo do DNA**. Maceió: EDUFAL, 2006. p. 15-22.

SMARRA, A. L. S.; PARADELA, E. R.; FIGUEIREDO, A. L. S. **A Genética Forense no Brasil**. Scientific American Brasil.2006. 51:83.

VELHO, J. A.; GEISER, G. C.; ESPINDULA, A. **Ciências Forenses – Uma introdução às principais áreas da criminalística moderna**. 2ª edição. Campinas: Millennium, 2013. p. 229-245.

VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR: Aplicações e padronização de reações**. 2006. Disponível em: <<http://www.etallcorp.xpg.com.br/aula1b.pdf>>. Acesso em 23 de Janeiro 2014.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 931p