

Técnicas de biologia molecular na genética forense

Molecular biology techniques in forensic genetics

Marina Abrantes de Aguiar

Professora Doutora Fernanda Marconi Roversi

Resumo

O avanço da tecnologia na ciência resultou em um grande impacto na genética e ciência forense. O estudo forense tem um papel extremamente importante para auxiliar a justiça no que diz respeito a evitar um próximo crime ou prender o suspeito através de técnicas moleculares para identificação do ácido desoxirribonucleico (DNA). A identificação e a coleta de vestígios biológicos, junto com as técnicas inovadoras da biologia molecular, tais como reação em cadeia polimerase (PCR), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR), *Short Tandem Repeats* (STR), *DNA fingerprint*, permitiram condenar ou absorver um suspeito com uma única gota de sangue, resquícios de sêmen ou um fio de cabelo. Dessa forma, a genética forense tem ajudado na identificação e na solução de casos criminais, visto que cada indivíduo possui um perfil genético único, sendo a análise do genoma humano uma ótima ferramenta para identificação de um suspeito. .O presente artigo trata da importância da área científica, através de técnicas e de conhecimentos sobre a genética e a biologia molecular, no auxílio da justiça, principalmente no que diz respeito a elucidação de crimes.

Palavras chaves: biologia molecular, cena do crime, estudo forense, vestígios biológicos, coleta, acondicionamento e transporte.

Summary

The advancement of technology in science has an important impact on genetics and forensic science. . The forensic study has an extremely important role in helping justice in relation to avoid the near crime or arrest the suspect through molecular techniques to identify DNA. The identification and collection of human being biological evidence with molecular biology techniques, such as polymerase chain reaction (PCR), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR), *Short Tandem Repeats* (STR) *DNA fingerprint*, allowed to condemn or absorb a suspect with a single drop of blood, semen remains or hair. Thus, forensic genetics has helped a lot in identifying and solving criminal cases, since each individual has a unique

genetic profile, since analysis of the human genome has been a great tool for identifying a suspect.. This article deals with the importance of the scientific area, using techniques and knowledge about the genetics and molecular biology, in aid of justice, particularly with regard to elucidating crimes.

Key words: molecular biology, crime scene, forensic study, biological traces collection transport and storage.

Introdução

A biologia molecular corresponde ao estudo da biologia em nível molecular, na qual são analisados o material genético e a sua estrutura, buscando compreender os seus produtos de expressão, as proteínas. Desse modo, a biologia molecular estuda os protótipos moleculares baseados em um aprofundamento genético e bioquímico. A principal função da biologia molecular é estudar os diversos sistemas celulares, incluindo a relação entre ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e síntese proteica (Cox et al., 2012). É uma área extremamente abrangente e tem auxiliado muito em pesquisas científicas e na identificação humana para a investigação criminal.

O Perito Criminal é responsável por trabalhar a serviço da justiça, para encontrar ou proporcionar a chamada prova técnica ou prova pericial, mediante a análise científica de vestígios produzidos e deixados na prática de delitos. Os peritos criminais de local de crime realizam a análise da cena de crime, identificando, registrando, coletando, interpretando e armazenando vestígios. Esses peritos também são responsáveis por estabelecer a dinâmica e a autoria dos delitos e realizar a materialização da prova que será utilizada durante o processo penal. Este é responsável por encontrar os vestígios biológicos na cena do crime.

Em meados da década de 80, ocorreu um grande avanço na área de biologia molecular, principalmente nas técnicas moleculares e nas análises precisas da molécula de DNA. Essas técnicas são de suma importância, pois permitem a identificação humana através da análise de materiais biológicos para a identificação criminal. As realizações das técnicas de Biologia Molecular, em sua maioria, requerem como amostra de DNA. Para isso, são realizados diferentes técnicas como a reação em cadeia polimerase (PCR), *restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *variable number tandem repeat* (VNTR), *short Tandem Repeats* (STR), *DNA fingerprint* para o isolamento do DNA, no qual todas essas técnicas utilizam moléculas de DNA encontradas principalmente na cena do crime.

São muitos vestígios biológicos encontrados na cena do crime, sendo os principais para identificação do perfil genético: sêmen, sangue, fezes, urina, pêlos, tecidos, unha, saliva, ossos, dentes e restos mortais. Para cada material biológico existem regras a serem seguidas para a coleta, o acondicionamento, a preservação e o encaminhamento desses materiais para análise em laboratórios criminais. Qualquer material que se destine à análise de DNA deverá, desde sua coleta até seu encaminhamento final, ser tratado de forma cuidadosa e especial, pois são materiais de fácil degradação e contaminação, assim, podendo perder seu real valor para a identificação forense e como prova criminal.

A coleta é o processo essencial para a solução dos casos, pois amostras que não estiverem adequadamente coletadas, identificadas e documentadas podem ser questionadas e são passíveis de não serem analisadas; (Rocha et al., 2011).

Amostras biológicas na forma líquida como sangue, esperma e saliva deverão ser coletados através de materiais próprios compostos de haste longa, flexível, swabs e materiais estéreis. Estes materiais deveram secar em temperatura ambiente, em local com ventilação, e conservado longe da luz solar para evitar degradações.

Os instrumentos utilizados durante a coleta na cena do crime deverão ser, preferencialmente, descartáveis, pois é muito fácil ocorrer contaminações exógenas na amostra. Em caso de matérias e instrumentos não descartáveis, não se deve utilizar o mesmo instrumento para coletar diferentes amostras.

O armazenamento é o ato ou efeito de armazenar, guardar em algum lugar de forma que seja possível resgatá-la, consultá-la ou usá-la posteriormente. Pode-se armazenar diversos produtos, desde sólidos, líquidos ou gases. O armazenamento de uma amostra corresponde a uma parte essencial para não perder a amostra e seu valor judicial. Portanto, deve armazenar corretamente todos os vestígios biológicos encontrados na cena do crime. Muitos materiais biológicos quando encontrados e não armazenados adequadamente podem ser desnaturados, degradados, sofrerem interferências exógenas, tal como contaminação. Para períodos longos de armazenamento, os materiais poderão ser congelados a -20°C . Para a coleta e o armazenamento de urina e outros líquidos corpóreos deverá ser obtida a maior quantidade possível com seringa ou pipeta plástica e armazenada sob refrigeração a 4°C .

Todos os vestígios biológicos encontrados no local do crime devem ser fotografados antes de serem manuseados (Jobim *et al* 2003). É indispensável durante a

coleta a proteção individual e a proteção do vestígio. Em relação a proteção do vestígio, deve-se isolar e proteger a cena do crime o mais rápido possível, fotografar todos os vestígios antes da coleta, fazer a coleta de material próximo ao vestígio para servir de controle, documentar cada local de coleta, identificar corretamente os envelopes e recipientes, trocar as luvas a cada coleta distinta e, preferencialmente, usar material descartável. Os vestígios úmidos e líquidos devem ser enviados e transferidos o mais rápido possível para o laboratório, sempre embalando as amostras em papel vegetal e, posteriormente, em envelope de papel pardo separadamente. É importante evitar ao máximo transitar no local e ter cuidado no manuseio e transporte dos vestígios para mantê-los conforme encontrado e armazenar em local de acesso restrito (Silva *et al* 2008).

Materiais e métodos

Esse artigo consistiu em uma revisão bibliográfica através de pesquisas explicativas onde os dados foram coletados em livros específicos e nos principais sites de busca de artigos científicos, tais como *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), portal Capes, Literatura Latino-Americana em Ciências de Saúde (LILACS), com resumos disponíveis nos bancos de dados informatizados selecionados e texto disponível na íntegra na internet ou que pode ser fornecido pela fonte original.. Foram incluídos trabalhos publicados em revistas indexadas, monografias, dissertações e teses científicas que continham dados sobre técnicas de biologia molecular auxiliando na genética forense. Foram encontrados 12 artigos, no qual foram estudados em sua plenitude e compilados. Esse artigo corresponde a uma análise não experimental que visa a coleta de dados sobre técnicas de biologia molecular realizada por meio de consulta a publicações de autores de referência na área e posterior leitura crítica dos títulos e dos resumos.

Discussão

Para que os vestígios biológicos tenham valor jurídico, é necessário que estes materiais encontrados na cena do crime, estejam preservados. Qualquer material biológico encontrado na cena do crime e que se destine a análise do DNA deve ser tratados com cautela, de forma cuidadosa, pois estes são materiais de fácil degradação e contaminação e qualquer desvio, o valor do vestígio biológico judicial pode ser comprometido. Assim, a coleta, do acondicionamento e transporte dos vestígios biológicos são muito importantes. De forma geral, todos os vestígios biológicos encontrados na cena do crime, devem ser fotografados, antes de ser manuseados, pois a foto é uma prova, e além disso, ressaltar a importância da coleta correta dos materiais biológicos, sua forma de acondicionar e transportar para um laboratório de pesquisas genéticas, pois qualquer desvio, qualquer degradação o material perde o valor judicial e não é possível condenar ou absolver um suspeito.

As principais técnicas de biologia molecular utilizadas na investigação forense são a reação em cadeia polimerase (PCR), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *variable number tandem repeat* (VNTR), *short tandem repeats* (STR), DNA *fingerprint* para o isolamento do DNA (Koch *et al* 2008).

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica de Biologia Molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida. Com a PCR, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas milhões de vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida e fiável dos marcadores genéticos de doenças infecciosas, doenças genéticas e para a identificação de um perfil genético (Moreira *et al* 2012).

O uso da tecnologia de Reação em Cadeia da Polimerase aumentou enormemente a capacidade dos cientistas para estudar o material genético. Desde a sua invenção por cientistas da Cetus Corporation em 1983, a PCR mudou a forma como se realiza investigação e diagnóstico médico. A PCR encontra sua principal aplicação em situações onde a quantidade de DNA disponível é reduzida, como ocorre na medicina forense, onde pequenas amostras de DNA retiradas da cena de um crime (pedaços de cabelo, gotas de sangue ou saliva, pedaços de pêlo ou até mesmo a minúscula quantidade de DNA deixada em uma impressão digital) (Koch *et al* 2008).

Existem três fases básicas ou ciclos para cada reação de PCR. Cada ciclo contém um ou mais passos e duas variáveis em cada passo: a temperatura e a duração.

Inicialmente, ocorre a etapa de desnaturação inicial, que consiste de um único passo de abertura da dupla fita de DNA por aumento de temperatura (a 94°C). A seguir, ocorrem as etapas que são repetitivas para resultarem em uma amplificação exponencial: (1) Etapa de Desnaturação: abertura da dupla fita de DNA por aumento de temperatura; (2) Etapa de anelamento: este é o passo que possibilita os primers a se anelarem a fita simples desnaturada; e (3) Etapa de extensão: é neste passo que a *Taq DNA polimerase* age para estender o molde. Regularmente ela é realizada a temperatura de 72°, que representa a atividade enzimática ótima. Após esse ciclo repetitivo, ocorre uma etapa de extensão final única possibilitando que toda amplificação semi-iniciada se complete (Koch *et al*, 2008).

A PCR é a principal técnica utilizada no estudo forense, pois é de fácil aplicação, não tem custo tão elevado e precisa apenas de microlitros para realizar o processo, porém, um problema muito comum na técnica PCR é o aparecimento de um *smear*, uma espécie de mancha ou rastro que tem como causas mais frequentes condições pouco específicas para o *annealing* dos *primers* ou DNA de má qualidade, fragmentado ou com contaminante. Uma das soluções para contornar o aparecimento de *smears* é a aplicação do *nested* – PCR (Rebouças *et al* 2004). A reação em cadeia da polimerase aninhada (*nested* PCR) é uma modificação da reação em cadeia da polimerase destinada a reduzir a ligação não específica de produtos devido à amplificação de locais de ligação de iniciadores inesperados.

O *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), traduzido como “Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição”, é uma técnica bastante utilizada para o estudo do genoma, pois indivíduos diferentes possuem sequências de nucleotídeos diferentes ao longo da fita de DNA. Nesta técnica utilizam-se enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios específicos, gerando fragmentos de diferentes tamanhos que são separados e visualizados em forma de bandas após a eletroforese. Cada indivíduo apresentará o seu padrão de fragmentos, chamado ‘perfil de digestão’, detectado pelo número e tamanho dos fragmentos gerados (Ceccato *et al*, 2012). Porém, com a criação da técnica de PCR (Polymorphism Chain Reaction), desenvolvida em 1985 por Kary Mullis, a identificação pelos marcadores microsatélites (STR), tomou o lugar do RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) ou Polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA), por sua praticidade, rapidez e ótima relação de custo-benefício (Pena *et al* 1993).

O *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) é um método que se baseia na existência de uma sequência repetitiva específica ativa em diferentes indivíduos de uma população ou nos dois homólogos diferentes do cromossomo num indivíduo diplóide. O VNTR consiste de regiões denominadas minisatélites ou repetição em tandem de número variável. Os VNTRs exibem uma enorme variabilidade e são constituídos de 9 à 100 pares de bases repetidos sequencialmente em loci cromossômicos. Uma repetição em série (“*tandem repeat*”) é uma sequência curta do DNA que é repetido na forma de “*head-to-tail*” num locus cromossômico específico. As repetições em série são evidenciadas ao longo de todo o genoma humano, sendo que algumas sequências são encontradas em somente um local – um único locus – e o número de unidades repetidas varia entre indivíduos. É um técnica que constitui um contributo na investigação forense na análise de impressões digitais (Góes *et al* 2002).

A expressão DNA "*Finger-Print*" (ou Impressões Genéricas) designa uma técnica de separação de segmentos de DNA que permite a identificação genética dos indivíduos. Recorrendo a marcadores genéticos, a PCR, a eletroforese e ao sequenciamento, obtém-se padrões de bandas (caso se utilizem géis) ou de picos (caso se utilizem sequenciadores automáticos) e os perfis obtidos são comparados com um padrão e os indivíduos são identificados. Esta técnica é muito utilizada na investigação criminal para identificar criminosos a partir de resíduos de DNA (pele, sangue, esperma, cabelos, entre outros) ou em testes de paternidade para identificar os pais. (Koch *et al* 2008).

Testes de DNA se tornam eficientes por estarem associados a grande sensibilidade dos exames de DNA. Além disso, o DNA é uma molécula robusta, relativamente resistente aos fatores ambientais, ácidos, alcalis e detergentes, diferentemente dos determinantes protéicos, lipídicos e carboidratos (Dolinsky *et al* 2006).

O uso do DNA para fins forenses, não irá por si só provar a culpabilidade ou inocência de criminosos, mas irá relacioná-lo com a cena do crime. Aceita em processos judiciais por todo o mundo, o uso das técnicas de biologia molecular na área forense é de grande valia, pois podem ser utilizadas em quase todos os tipos de investigação tais como: crime sexual, identificação de cadáveres carbonizados, mutilados ou em decomposição, relação entre instrumento lesivo e vítima, entre outros (Dolinsky *et al* 2006).

Apesar de grande eficiência os exames em DNA, estes apresentam certas limitações no que diz respeito às peculiaridades da análise. Com frequência, vestígio de outros materiais biológicos ou impurezas colhidas com as amostras biológicas, como por exemplo, fragmentos de tecidos coloridos, inibem por exemplo a reação de PCR (Koch *et al* 2008) ou produzem reações cruzadas. Outras limitações que as técnicas baseadas em DNA enfrentam são a falta de padronização dos métodos de análise, falta de banco de dados de DNA, com informações genéticas de criminosos e desaparecidos (Koch *et al* 2008).

Conclusão

O avanço da biologia molecular em meados da década de 80, contribuiu muito para investigação criminal, pois apenas uma porção de algum vestígio biológico, como sangue, sêmen ou até cabelos e pele, pode ser utilizado na identificação humana através de técnicas moleculares como reação em cadeia polimerase. Isso deve-se ao fato de que nestas amostras encontradas na cena do crime, possuem o material genético, o ácido desoxirribonucleico (DNA).

O estudo da genética forense junto com as técnicas inovadoras da biologia molecular auxilia na justiça. As técnicas de biologia molecular são excelente para investigação criminal, e contribuíram muito para solucionar os casos, pois cada indivíduos possui seu próprio material genético, exceto gêmeos monozigóticos.

Os procedimentos analíticos utilizados para determinação de um perfil genético são totalmente dependentes do DNA, portanto é imprescindível que se tenha muito cuidado na hora de coletar, armazenar e transportar o material biológico, pois estes podem perder o valor judicial devido contaminações exógenas ou degradações.

O Perito cabe um papel fundamental para este processo de coleta, armazenamento e transporte dos vestígios biológicos até o laudo pericial.

Em suma, a maioria dos vestígios biológicos encontrados na cena do crime, são fáceis de serem coletados, manuseados, acondicionados e transportados, e são necessários apenas microlitros para conseguir realizar a análise. Na maioria dos casos, utiliza-se a PCR para amplificação do DNA nuclear e, desse modo, tentar identificar o suspeito.

Por fim, cabe ressaltar a importância da biologia molecular no estudo forense para identificação de um suspeito auxiliando a justiça, pois estas técnicas permitiram o sequenciamento de todos os três bilhões de pares bases do genoma humano.

Referências bibliográficas

Costa A, Silva J, extração de DNA em genética forense, disponível em <<http://docslide.com.br/documents/monografia-extracao-de-dna-em-genetica-forense.html> > Acesso em: 15 mar. 2016.

Cresta L, Miranda Campelo Pereira L, DNA forense disponível em <<http://publicacoes.unigranrio.com.br/index.php/sare/article/viewFile/242/231> > acesso em 17 set. 2016.

DOLINSKY, Luciana Cresta, PEREIRA, Lissiane M. C. Veras. DNA Forense – Artigo de Revisão disponível em <<http://publicacoes.unigranrio.edu.br/index.php/sare/article/view/242/231>> Acesso em 17 out. 2016. .

França G, Medicina legal, língua portuguesa, editora Guanabara, décima edição 2015.

Grazinoli G, consentimento informado em genética disponível em <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-569X2013000200015&lang=pt > acesso 18 jul. 2016.

Jobim, Identificação humana pelo DNA - Identificação humana, disponível em <<http://www.redalyc.org/html/260/26029237009/>> acesso em 18 mar. 2016.

Laboratorio G, Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular, disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v46n5/06.pdf>> acesso em 13 ago. 2016.

Luciana C, DNA forense, artigo de revisão, disponível em <http://www.biologia.bio.br/curso/2%C2%BA%20per%C3%ADodo%20Faciplac/Gen%C3%A9tica/DNA%20forense_artigo%20de%20revis%C3%A3o.pdf > Acesso em 15 mar. 2016.

Koch, técnicas de biologia molecular na genética forense , A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão RBAC, vol. 40(1): 17-23, 2008

Mendes J, COLETA E PRESERVAÇÃO DE VESTÍGIOS BIOLÓGICOS PARA ANÁLISES CRIMINAIS POR DNA, ano 2003, disponível em <<http://www.redalyc.org/html/260/26029237009/>> Acesso em 15 out. 2016.

Massuda, identificação humana por DNA, disponível em <<file:///C:/Users/Cliente/Desktop/MARINA%20USF/ARTIGO/Apostila-de-Pericia-Criminal-Thiago-Massuda.pdf>> acesso em 13 ago. 2016.

Rezende M, Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular, 20 out. 2010 , disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/jbpm1/v46n5/06.pdf> > acesso em 18 maio. 2016.

Pena, S.D.J.; JEFFREYS, A.J. Breve introdução às impressões digitais do DNA. Ver. Bras. Genet, 1993. v.16: p.857-879.

Silva, DNA forense: coleta de amostras biológicas em locais de crime para estudo do DNA. 2. ed. Maceió: UFAL, 2006. 84 p.

Silva V, uso das técnicas de biologia molecular na genética forense, disponível em < http://www.derechocambiosocial.com/revista034/USO_DAS_TECNICAS_DE_BIOLOGIA_MOLECULAR_NA_GENETICA_FORENSE.pdf > acesso em 25 ago. 2016.