

## OS MARCADORES MOLECULARES NA ELUCIDAÇÃO DE CRIMES POR MEIO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE DE DNA

Júlia Carolina Altrão Barros<sup>1</sup>, Gabriel Capella Machado<sup>2,5</sup>, Erli de Souza Bento<sup>3,5</sup>, Ana Claudia Conde Peres<sup>4,5\*</sup>

<sup>1</sup> Graduanda em Biomedicina, Faculdades Integradas de Três Lagoas – FITL/AEMS; <sup>2</sup> Doutor em Ciências Biológicas (Genética) – UNESP; <sup>3</sup> Bióloga, Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas – UNESP; <sup>4</sup> Mestre em Biologia Animal – UFMS; <sup>5</sup> Docente das Faculdades Integradas de Três Lagoas - FITL/AEMS

\* autor correspondente: anaperestl@gmail.com

### RESUMO

As ferramentas de biologia molecular aumentaram a capacidade dos cientistas forenses de caracterizar evidências biológicas a ponto de ser viável analisar amostras mínimas e atingir altos níveis de individualização. Mesmo com a maturidade do campo do DNA forense, ainda existem várias áreas onde melhorias podem ser feitas. Isso inclui: permitir a digitação de amostras de quantidade e qualidade limitadas; usando informações genéticas e novos marcadores para fornecer pistas investigativas; aprimorando a automação com robótica, diferentes produtos químicos e melhores ferramentas de software; empregando plataformas alternativas para tipagem de amostras de DNA; desenvolver dispositivos microfluídicos/microfabricação integrados para processar amostras de DNA com maior rendimento, tempos de resposta mais rápidos, menor risco de contaminação, mão de obra reduzida e menor consumo de amostras de evidências; e explorar o sequenciamento de alto rendimento, especialmente para atribuição em casos de perícia microbiana. Lacunas de conhecimento e novas direções foram identificadas onde a biologia molecular provavelmente guiará o campo da ciência forense. Esta revisão tem como objetivo fornecer uma discussão teórica sobre os marcadores moleculares na elucidação de crimes por meio de técnicas de análise de DNA, onde serão abordados os principais marcadores moleculares utilizados em técnicas forenses, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese e *southern blotting*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *short tandem repeats; polymerase chain reaction; ácido desoxirribonucleico.*

### 1 INTRODUÇÃO

A palavra “forense” se origina de *forensis*, uma palavra latina que significa “de ou antes do fórum”. Frequentemente, o termo “forense” é usado indistintamente com ciência forense, no entanto, tem muitas interpretações. A ciência forense cobre uma ampla gama de especialidades, como criminalística, análise de evidência digital, experiência em impressão digital, odontologia, enfermagem, patologia, toxicologia e documentos questionados (ROCHA et al., 2018).

A criminologia se dedica à identificação, individualização e reconstrução de evidências usando ciência natural, lógica e crítica. A análise das variações

genéticas humanas foi o ímpeto para o avanço na área da genética forense (SEBASTIANY et al., 2013).

A ciência forense adotou o uso de ferramentas de biologia molecular do ácido desoxirribonucleico (DNA) para fins diagnósticos mais do que qualquer outro campo científico. A área foi impulsionada pela necessidade de técnicas de teste de identidade humana de alta resolução. Nos últimos 20-25 anos, a ciência forense desenvolveu e implementou várias tecnologias robustas e confiáveis de tipagem de DNA (SANTOS, 2018).

O objetivo deste estudo é trazer uma revisão bibliográfica sobre a utilização dos marcadores moleculares na elucidação de crimes por meio de técnicas

de análise de DNA, onde serão abordados os principais marcadores moleculares utilizados em técnicas forenses, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), eletroforese e southern blotting. Para tal proposta, este estudo analisou artigos científicos disponíveis na base de dados do *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), que contivessem as palavras-chaves *short tandem repeats*, *polymerase chain reaction*, ácido desoxirribonucleico. A relevância do presente estudo está no aprofundamento técnico e científico sobre o tema em questão.

## 2 UMA VISÃO GERAL DO DNA

O ácido desoxirribonucleico, mais conhecido como DNA, é uma molécula complexa que contém todas as informações necessárias para construir e manter um organismo. Todos os seres vivos têm DNA em suas células. Na verdade, quase todas as células de um organismo multicelular possuem o conjunto completo de DNA necessário para esse organismo (ROHREGGER et al., 2020).

No entanto, o DNA faz mais do que especificar a estrutura e função dos seres vivos, ele também serve como a unidade primária de hereditariedade em organismos de todos os tipos. Em outras palavras, sempre que os organismos se reproduzem, uma parte de seu DNA é passada para seus descendentes. Essa transmissão de todo ou parte do DNA de um organismo ajuda a garantir um certo nível de continuidade de uma geração para a outra, ao mesmo tempo que permite pequenas mudanças que contribuem para a diversidade da vida (SEBASTIANY et al., 2013).

Os corpos humanos são feitos de células. Dentro de cada célula existem vários compartimentos. Este normalmente inclui um núcleo, que contém DNA. O DNA nuclear humano possui em geral, 46 cromossomos, no qual um indivíduo recebe 23 cromossomos de cada um de

seus pais biológicos. Dois são os cromossomos que determinam o sexo, X e Y, e os demais são chamados cromossomos autossômicos (FURTADO, 2019).

Um cientista pode identificar as características do DNA de um indivíduo de várias maneiras diferentes. A maneira mais óbvia é sequenciar todo o genoma da pessoa (uma técnica conhecida como sequenciamento do genoma completo). Essencialmente, isso envolve a identificação e registro da ordem de todos os 3 bilhões de pares de bases (GRAZINOLI; LEAL, 2015).

Uma alternativa é se concentrar apenas nas áreas do genoma que são conhecidas por variar entre os humanos, como as repetições curtas em tandem, do inglês: *short tandem repeat* (STR). Estas são cadeias repetitivas de bases que ocorrem em certos pontos do genoma. O comprimento dessas cadeias será diferente de pessoa para pessoa. Por exemplo, em um determinado ponto no genoma de qualquer pessoa, a cadeia AT-TAT pode aparecer várias vezes (ROCHA et al., 2018).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphism*) são variações no nível de pares de bases do DNA. Em certos pontos do genoma, uma pessoa pode ter um G e outro pode ter um C. SNPs são a forma mais simples e mais comum de variação genética responsável por cerca de 90 por cento das variações em humanos. Por conta própria, um SNP não seria particularmente útil para identificar uma pessoa em particular, mas um grande número de 'painéis SNP' ou 'matrizes SNP' pode ser útil (GÓES et al., 2002).

A análise do ácido desoxirribonucleico é uma ferramenta biológica que revolucionou as investigações legais, pois qualquer material biológico possui informações genéticas de sua origem, o que torna possível a identificação de suspeitos. A ciência forense tem como objetivo principal ajudar nas investigações criminais e tem se mostrado uma área

bastante ampla. Não apenas auxiliam em Direito Penal, mas em alguns casos cíveis (SILVA; FRANGIOSA, 2018).

Na década de 1980, o cientista Alec Jeffreys estudou o gene da mioglobina e descobriu que algumas regiões desse gene se distinguem de pessoa para pessoa e que as regiões que mudavam entre os indivíduos eram espalhadas pelo genoma. Definiu-se então a expressão “DNA fingerprinting”, que significa impressão digital do DNA. A partir da descoberta de Jeffreys, analisar o material genético tornou-se indispensável para os estudos da ciência forense (SILVA; FRANGIOSA, 2018).

As técnicas de análise de DNA utilizando os marcadores moleculares permite solucionar crimes envolvendo violência sexual, identificação de corpos de vítimas de acidentes aéreos, determinação da paternidade, identificação de suspeitos através de saliva, pelos em roupas e células de pele em cenas de crime, ou ainda inocentar pessoas incriminadas injustamente. PCR, eletroforese e *southern blotting* são técnicas moleculares usadas na identificação de DNA humano (SILVA; FRANGIOSA, 2018).

Os marcadores moleculares são qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou ainda algum segmento específico de DNA, sendo eles expressos ou não. Primeiramente é feita a extração do DNA e na sequência a análise dos marcadores moleculares, que são separados em minissatélite (VNTR's), microssatélite (STR's), polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), cromossomo Y (crY) e DNA mitocondrial (mtDNA) (MULLHER; MARCONDES; NAVARRO-SILVA, 2010).

A cada dia, os marcadores moleculares, bem como as técnicas empregadas na ciência forense, vêm adquirindo mais importância visto que, em 2016 foram publicados quase 4.000 trabalhos sobre o assunto, enquanto em 1980 apenas vinte e cinco. O avanço na ciência legal é notório considerando os benefícios e algumas

limitações das técnicas. A análise do material biológico em muitos casos vem sendo decisiva, principalmente no direito penal (OLIVEIRA; FILHO, 2018).

Os cientistas discutiram por muitos anos sobre qual molécula carregava as instruções biológicas da vida. A maioria dos cientistas acreditava que o DNA era uma molécula muito simples para desempenhar este papel. Desta forma, eles acreditaram que as proteínas eram mais propensas a realizar esta função vital por causa de sua maior complexidade e ampla variedade de formas (MULLHER; MARCONDES; NAVARRO-SILVA, 2010).

Uma compreensão do papel crítico do DNA como material genético tornou-se claro em 1952, com início nos experimentos realizados por Alfred Hershey e Martha Perseguir. Em 1953, o trabalho de James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins e Rosalind Franklin, nos padrões de difração de raios-X, contribuiu significativamente para descobrir a estrutura de dupla hélice do DNA; uma estrutura que permite transportar informações biológicas de uma geração para a próxima (ALMEIDA, 2003).

O genoma humano foi completamente traduzido após um monumental esforço de sequenciamento, e hoje, sabe-se que os 3 bilhões de bases que o compõe são distribuídos entre 23 cromossomos. Mais de 30.000 genes (códigos para proteínas), representando menos de 5% de seu comprimento. O projeto genoma humano confirmou o que os cientistas já sabiam, que as regiões não codificantes do genoma contêm, entre outras coisas, tratos de sequências repetitivas (MULLHER; MARCONDES; NAVARRO-SILVA, 2010).

### 3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

As reações em cadeia da polimerase (PCR), também chamada de "fotocópia molecular" é uma técnica rápida e

barata usada para “amplificar” - copiar - pequenos segmentos de DNA. Como quantidades significativas de uma amostra de DNA são necessárias para análises moleculares e genéticas, os estudos de pedaços isolados de DNA são quase impossíveis sem amplificação por PCR. Muitas vezes anunciado como um dos avanços científicos mais importantes em biologia molecular, a PCR revolucionou o estudo do DNA a tal ponto que sua criadora, Kary B. Mullis, recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1993 (MULLHER; MARCONDES; NAVARRO-SILVA, 2010).

Uma vez amplificado, o DNA produzido por PCR pode ser usado em diversos procedimentos laboratoriais. Por exemplo, a maioria das técnicas de mapeamento no Projeto Genoma Humano dependia de PCR. A PCR também é valiosa em uma série de técnicas laboratoriais e clínicas, incluindo impressões digitais de DNA, detecção de bactérias ou vírus (particularmente AIDS) e diagnóstico de doenças genéticas (SILVA; FRANGIOSA, 2018).

Para amplificar um segmento de DNA usando PCR, a amostra é inicialmente aquecida para que o DNA se desnature ou se separe em dois pedaços de DNA de fita simples. Em seguida, uma enzima chamada “Taq polimerase” sintetiza - constrói - duas novas fitas de DNA, usando as fitas originais como modelos. Esse processo resulta na duplicação do DNA original, com cada uma das novas moléculas contendo uma velha e uma nova fita de DNA. Cada uma dessas novas fitas pode ser usada para criar duas novas cópias e assim por diante (FRAIGE; REGIANE; CARRILHO, 2013).

O ciclo de desnaturação e síntese de novo DNA se repete 30 ou 40 vezes, resultando em mais de um bilhão de cópias exatas do segmento de DNA original. Todo o processo de ciclo do PCR é automatizado e pode ser concluído em apenas algumas horas. É dirigido por uma máquina chamada termociclador, que é

programada para alterar a temperatura da reação a cada poucos minutos para permitir a desnaturação e síntese do DNA (SILVA; FRANGIOSA, 2018).

#### 4 PERFIL DE STR TRADICIONAL - A principal técnica de análise de DNA

A maior parte do nosso DNA é idêntico ao DNA dos outros. No entanto, existem regiões herdadas de nosso DNA que podem variar de pessoa para pessoa. Variações na sequência de DNA entre indivíduos são denominadas “polimorfismos”. As sequências com o maior grau de polimorfismo são muito úteis para análise de DNA em casos forenses e testes de paternidade. O estudo é baseado na análise da herança de uma classe de polimorfismos de DNA conhecidos como “*short tandem repeats*” ou simplesmente STRs (SEBASTIANY et al., 2013).

STRs são sequências curtas de DNA, normalmente de comprimento de 2-5 pares de bases, que são repetidas várias vezes em forma de cabeça-cauda. Os polimorfismos em STRs são devidos ao número diferente de cópias do elemento de repetição que pode ocorrer em uma população de indivíduos (SILVA; FRANGIOSA, 2018).

Durante o perfil do DNA, as células são coletadas para obter acesso ao seu DNA. Em seguida, os cientistas forenses copiam as regiões de DNA de interesse e medem o comprimento das sequências repetidas em vários *loci*. O comprimento, em vez da sequência exata das repetições, serve como um marcador para perfis de DNA porque o comprimento da repetição é suficiente para distinguir entre os indivíduos. Embora existam muitos loci STR no genoma humano, os cientistas forenses escolhem para analisar um pequeno conjunto de marcadores, raramente mais de um *locus* por cromossomo. Escolher loci distantes um do outro aumenta a probabilidade de que o número de repetições em um *locus* seja herdado independentemente do número de

repetições em outro *locus*, aumentando assim a raridade de qualquer perfil de DNA específico (SEBASTIANY et al., 2013).

Desde o início de 1990, a principal técnica de análise de DNA usada em investigações criminais para obter perfis de DNA tem sido o perfil de STR - geralmente referido como "STR tradicional profiling". Gerar um perfil de DNA a partir de uma amostra (usando análise de DNA) é uma parte fundamental do processo de investigação criminal, uma vez gerado, os perfis podem ser comparados a cada outro para ver se há uma correspondência. Por exemplo, um perfil de cena de crime pode ser comparado a um perfil de uma pessoa conhecida, como um suspeito, para ver se há uma correspondência (SANTOS, 2018).

O perfil de STR também é a única técnica atualmente usada em todo o mundo para gerar DNA perfis para bancos de dados de cena de crime e bancos de dados de pessoas conhecidas. Inicialmente, os kits de análise usados para o perfil de STR para fins de banco de dados possui foco em seis loci nos cromossomos autossômicos mais um teste de sexo (GRAZINOLI; LEAL, 2015).

O sucesso e a ampla aceitação da tipagem de DNA na ciência forense se devem em parte à sua sensibilidade de detecção (pelo uso de PCR) e à capacidade de analisar amostras minuciosas. No entanto, quando apenas algumas moléculas de modelo estão disponíveis para PCR, a amplificação estocástica ocorrerá, e o grau do efeito está indiretamente relacionado ao número de moléculas de modelo. Para loci de (STR), cujos alelos são baseados em um número variado de repetições em tandem, os efeitos estocásticos se manifestam como um desequilíbrio substancial de dois alelos em um determinado locus heterozigoto (FRAIGE; REGIANE; CARRILHO, 2013).

Os cientistas estão trabalhando para aumentar a sensibilidade da detecção para tipagem de DNA e prevê-se que

esse esforço continue. Amostras de baixa quantidade para identificação de restos mortais e crimes de alto volume (como roubos) são abundantes e podem fornecer pistas na solução desses crimes. Além disso, a digitação de níveis de rastreamento de DNA para rastrear indivíduos ou determinar falhas de segurança aumentaria ainda mais os esforços de contraterrorismo (FURTADO, 2019).

Existem muitas estratégias para permitir a geração de perfis de DNA. Isso inclui simplesmente aumentar o número de ciclos de PCR (de 28 para 34); redução do volume de PCR; implementar uma etapa de limpeza pós-PCR para concentrar a amostra para análise e remover íons competitivos; aumentar o tempo de injeção eletroforética; usando PCR interno; ou usando etiquetas fluorescentes de melhor relação sinal-ruído. Com esses métodos para aumentar a sensibilidade, no entanto, os mesmos efeitos estocásticos e preocupações de contaminação (denominada queda de alelo) persistem. Os cientistas usaram várias alíquotas de uma amostra para introduzir redundância e auxiliar na interpretação de quaisquer efeitos estocásticos e contaminação potencial. A questão da contaminação foi abordada ainda mais por meio da construção de laboratórios especializados e da implementação de protocolos para reduzir o risco de contaminação intralaboratorial (JUNIOR; SOUSA, 2014).

Aumentar as moléculas de modelo disponíveis obtidas a partir de amostras LCN é outra abordagem que deve ser considerada. O DNA (por exemplo, de sangue total ou células bucais) coletado em cotonetes não é removido de forma eficiente do dispositivo de coleta durante a extração. Frequentemente, há mais DNA ainda aprisionado no meio de coleta de amostra do que foi extraído (dados não mostrados) (FURTADO, 2019).

Os esforços devem se concentrar na extração mais eficiente do DNA dos dispositivos atuais de coleta de amostras. Recuperação de amostra mais eficiente e

estratégias de extração (como liberação induzida por voltagem e novas colunas de troca iônica) podem render mais moléculas modelo. Alternativamente, dispositivos de coleta melhores devem ser desenvolvidos que são mais eficientes na recuperação de amostras em cenas de crime, ou que melhor auxiliam na extração por serem inertes ao DNA ou se dissolvendo durante a extração para liberar completamente o DNA alojado dentro (GÓES et al., 2002).

As amostras forenses podem conter contaminantes do ambiente que inibem a amplificação por PCR. Mesmo quando há moléculas de molde suficientes para uma análise convencional, efeitos estocásticos podem ocorrer devido à presença de inibidores de PCR. Em essência, o número efetivo de moléculas modelo para a PCR é diminuído. Extratos de DNA que são purificados de inibidores de PCR, ou aditivos que podem ser usados para neutralizar os efeitos dos inibidores, são abordagens que aumentarão a confiabilidade da tipagem para amostras comprometidas (FRAIGE; REGIANE; CARRILHO, 2013).

O mecanismo da BSA funciona ligando-se aos inibidores ou estabilizando a polimerase. No entanto, o BSA não supera todos os inibidores; um aditivo que superaria uma gama mais ampla de inibidores de PCR teria benefícios óbvios para a análise de diversas amostras forenses desconhecidas. Alternativamente, a remoção do inibidor pode ser considerada (JUNIOR; SOUSA, 2014).

Outra abordagem que pode ser promissora para amostras de DNA de quantidade limitada é o uso de amplificação do genoma completo (WGA). Idealmente, o método WGA amplifica todo o DNA em uma amostra de maneira imparcial, produzindo quantidades substancialmente maiores de DNA que podem ser posteriormente analisadas usando ensaios forenses padrão. Os métodos WGA, no entanto, estão sujeitos a alguns dos mesmos efeitos estocásticos que a tipagem

LCN encontra. Uma técnica WGA conhecida como amplificação por círculo rolante (RCA) que usa um molde circular de DNA, poderia possivelmente evitar algumas das limitações estocásticas (ROCHA et al., 2018).

Com uma polimerase altamente processável, o RCA pode produzir quantidades de microgramas de DNA a partir de modelos circulares e - devido ao fenômeno do deslocamento da fita - produzir muitas cópias da mesma molécula alvo. Portanto, para explorar melhor a RCA, o DNA fragmentado em uma amostra de evidência poderia ser circularizado (FURTADO, 2019).

Os STRs são extremamente úteis em aplicações como a construção de mapas genéticos, localização de genes, análise de ligação genética, identificação de indivíduos, teste de paternidade, bem como diagnóstico de doenças. A análise de STR também tem sido empregada na população genética. No entanto, a aplicação de STRs à genética de populações requer uma compreensão mais detalhada do processo de mutação de STR. Podemos aplicar STRs para reconstruir a história da migração e evolução das espécies, bem como para avaliar a diversidade biológica em vários níveis de organização biológica. Um método de datação genética absoluta usa taxas de mutação como relógios moleculares. Esse relógio molecular baseado em STR, cuja taxa de mutação é muito alta, pode ser aplicado à evolução humana. Portanto, é provável que os STRs reflitam divergências relativamente recentes (MULLHER; MARCONDES; NAVARRO-SILVA, 2010).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação dos avanços da pesquisa acadêmica (genética, genômica, biologia celular, análise estatística etc.) ao campo da ciência forense visa facilitar o trabalho do perito para que ele possa tirar conclusões mais esclarecidas possíveis aos tribunais. A redução continua nos

custos da análise de sequenciamento de alto rendimento torna esse tipo de análise possível para laboratórios forenses. Já é possível a análise de mais de 230 marcadores genéticos (STR autossômico, STR sexual nos cromossomos X e Y, SNPs de identidade, SNPs de origem biogeográfica e fenotípica) em uma única reação.

A integridade dos dados produzidos pela análise de todos esses marcadores genéticos não será útil em todos os casos. No entanto, em casos complexos, otimizará a análise de vestígios e pistas úteis para a manifestação da verdade.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, D. F. de. 50 anos de DNA: história de um sucesso e de duas tragédias. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA. Águas de Lindóia. Conferência. 49, 2003.

FRAIGE, K.; TRAVENSOLO, R.; CARRILHO, E. Analysis of seven STR human loci for paternity testing by microchip electrophoresis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 56, p. 213–221, 2013. Acesso em: 9 jul 2021.

FURTADO, R. N. Edição genética: riscos e benefícios da modificação do DNA humano. *Revista Bioética*. v. 27, n. 2, 2019.

GÓES, A. et al. Identification of a criminal by DNA typing in a rape case in Rio de Janeiro, Brazil. *Sao Paulo Medical Journal*, v. 120, p. 77–79, 2002. Acesso em: 9 jul 2021.

GRAZINOLI G.; LEAL R. O Banco de Perfis Genéticos Brasileiro Três Anos após a Lei nº 12.654. *Revista Bioética y Derecho*, Barcelona, n. 35, p. 94-107, 2015.

MULLER, G.; MARCONDES, C. B.; NAVARRO-SILVA, M. A. Aplicação de marcadores microsatélites para o estudo de *Culicidae* (Diptera): revisão com especial referência a *Haemagogus*. *Bol Mal Salud Amb*. v. 50, n. 2, p.175-186, 2010.

ROCHA, C. et al. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics.*, v. 73, 2018.

ROHREGGER, R. et al., SYNTHETIC BIOLOGY AND GENETIC MANIPULATION: Risks, promises and responsibilities. *Ambiente & Sociedade* [online]., v. 23, 2020.

SEBASTIANY, A. P. et al. A utilização da Ciência Forense e da Investigação Criminal como estratégia didática na compreensão de conceitos científicos. *Educ. quím, Ciudad de México*, v. 24, n. 1, p. 49-56, 2013.