

TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS A PERÍCIA E CIÊNCIA FORENSE

Marcelo Fruehwirth¹

Robson Michael Delai²

Rafaela de Araujo Folha³

Fecha de publicación: 01/10/2015

SUMÁRIO: Introdução. Revisão de Literatura. **1** A informação genética e o DNA. **2** O uso do DNA em casos forenses. **3** Procedimentos de coleta do material biológico para fins forenses. **4** Extração de DNA. **5** Marcadores Moleculares. **6** Reação de Amplificação pela Polimerase – PCR e a quantificação do DNA. **6.1** A RT-PCR (A reação em cadeira da polimerase em Tempo Real) **7** Legislação relativa ao uso de técnicas moleculares na investigação forense no Brasil. Considerações Finais.

RESUMO: A biologia molecular é a ciência que estuda a estrutura e função do material genético. Na década de 80, a área forense foi revolucionada graças a introdução de técnicas e análises de DNA, que se tornaram uma poderosa ferramenta para a investigação criminal, sendo difundido em todos os países e aceito como prova nos tribunais. Essa revisão bibliográfica teve como objetivo elucidar dúvidas sobre o DNA, suas características em relação às técnicas moleculares utilizadas nas elucidações forense e sua descrição. Os processos envolvendo a biologia molecular nas ciências forenses incluem a coleta de

¹ Biólogo, Pós-Graduado em Perícia Forense e Análises Clínicas e Toxicológicas – Atenção Diagnóstica pela Faculdade Assis Gurgacz (PR).

² Biólogo, Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Professor do Centro Universitário Dinâmica das Cataratas (UDC).

³ Graduanda em Ciências Biológicas – Bacharelado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

amostras; extração, purificação e quantificação do DNA; análise das amostras e seus marcadores (STR, VNTR, SNP, RFLP, e outros); Utilização de PCR, eletroforese ou qPCR e a interpretação dos dados. Há necessidade da implantação do banco de dados genéticos no Brasil, como exemplo do CODIS, onde amostras biológicas são sequenciadas e armazenadas, toda via, apenas a regulamentação foi implantada. Novos estudos na área forense se fazem necessários, averiguando os procedimentos adotados por peritos e laboratórios no Brasil, a fim de relacionar os erros freqüentemente cometidos à má qualidade das amostras finais, podendo assim regulamentar os protocolos, evitando que possíveis falhas interfiram no processo judicial.

PALAVRAS-CHAVE: Biologia Molecular, DNA, Perícia, Forense.

ABSTRACT: Molecular biology is the science that studies the structure and function of genetic material. In the 80s, the forensic field has been revolutionized through the introduction of techniques and DNA analysis, which have become a powerful tool for criminal investigation, being disseminated in all countries and accepted as evidence in court. This literature review aimed to clarify doubts about DNA, the characteristics and the molecular techniques used in forensic elucidation and description. The processes involving molecular biology in forensic sciences include the collection of samples; Extraction, purification and quantification of DNA; analysis of samples and their markers (STR, VNTR, SNP, RFLP, and others); Using PCR, electrophoresis or qPCR and data interpretation. There is need for the establishment of the genetic database in Brazil, as an example of CODIS, where biological samples are sequenced and stored, anyway, only the regulation was implemented. New studies in forensic area are necessary, checking the procedures adopted by experts and laboratories in Brazil in order to relate the frequently errors to the poor quality of the final samples and can therefore regulate protocols, preventing possible failures in the judicial process.

KEYWORDS: Molecular Biology, DNA, Forensic Sciences, Forensic.

INTRODUÇÃO

A biologia molecular é a ciência que estuda a estrutura e função do material genético, tendo como foco as proteínas, que são seus produtos de expressão. Basicamente, a função da biologia molecular é investigar todas as interações que ocorrem com o DNA (*Ácido Desoxirribonucléico*), na formação do RNA (*Ácido Ribonucléico*) e as proteínas. Seu campo de estudo é muito abrangente, unindo bioquímica, biologia celular e também genética¹.

A partir do início da década de 80, grandes avanços na área molecular foram divulgados, propiciando grande impacto no campo da ciência, principalmente forense, graças as técnicas e análises de DNA, que se tornaram uma poderosa ferramenta para a identificação humana e para a investigação criminal^{2,3}

As primeiras técnicas forenses de identificação humana eram convenientes apenas para análise de DNA de evidências biológicas que contivessem células nucleadas. Atualmente, com a implementação do sequenciamento do DNA mitocondrial, essa limitação tem sido superada^{1,3}

As técnicas de biologia molecular aplicadas a área criminal concentram-se, em grande parte, em análises do DNA para identificação de um indivíduo a partir de cabelos, manchas de sangue e fluidos corporais, entre outros itens recuperados no local do crime. Essas técnicas são conhecidas como datiloscopia genética (*genetic fingerprinting*), embora o termo mais preciso e utilizado para designá-las seja perfil de DNA⁴

Segundo Koch & Andrade (2008)², o perfil de DNA é importante pois é diferente para cada indivíduo, tornando cada amostra única, com exceção de gêmeos univitelinos, que são geneticamente iguais, porque se originam de um só zigoto, formado pela fecundação de um óvulo por um espermatozóide, portanto, possuem a mesma sequência de DNA⁶³.

Em geral, em todas as cenas de crime encontram-se diversos tipos de vestígios biológicos, onde testes de DNA podem ser realizados, tornando-as evidências importantes, inclusive, sendo possível excluir inocentes e indicar suspeitos, cabendo ao perito identificar o tipo de amostra encontrada e qual melhor técnica de identificação, sem esquecer que os exames devem ser realizados com a utilização de métodos científicos e os laudos devem ser escritos em linguagem ética e juridicamente perfeita⁵

Ao longo dos anos, foram implantadas diferentes técnicas a fim de caracterizar e individualizar pessoas na área forense, como por exemplo a análise de impressões digitais, exames antropométricos e estudos envolvendo marcadores genéticos e bioquímicos (polimorfismos dos sistemas HLA, ABO e de outras proteínas séricas)^{1,6}.

O número de tribunais que têm aceitado evidências baseadas no DNA cresce a cada dia, levando-nos a crer que, em um futuro muito próximo, esta tecnologia será empregada em todo o Sistema Legal. Porém para que não ocorra nenhum tipo de erro e para maior precisão dos resultados, regras rígidas de coleta e processamento das amostras devem ser adotadas¹⁰.

Essa revisão bibliográfica teve como objetivo elucidar dúvidas sobre o DNA, suas características em relação às técnicas moleculares utilizadas nas elucidações forense e sua descrição.

REVISÃO DE LITERATURA

1 A informação genética e o DNA

Em seres humanos, o genoma nuclear é um resultado da combinação entre o genoma paterno e materno em proporções de 50% respectivamente. A interação resulta no genoma completo, onde apenas 0,1% dele é variável dentro da espécie⁷.

As informações genéticas individuais estão armazenadas sob a forma de ácidos nucleicos. Os ácidos nucleicos foram descobertos em 1869 por Friedrich Miescher e no início do século XX o bioquímico Kossel evidenciou a existência de dois tipos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). O DNA contém os genes (conjunto de nucleotídeos que em conjunto, expressam determinada informação), enquanto que o RNA serve como agente intermediário na atividade do gene. O RNA mensageiro (mRNA) é transcrito a partir do DNA e traduzido em seqüências de aminoácidos que formam as proteínas¹¹.

O DNA é uma molécula extremamente longa, formada por duas cadeias de polinucleotídeos enrolados de forma helicoidal e ligados transversalmente através de pontes de hidrogênio¹¹.

O DNA genômico é encontrado internamente ao núcleo de cada célula do corpo humano, e representa uma fonte de DNA para quase todas as aplicações forense. No DNA genômico estão inseridos todas as informações genéticas responsáveis pelas atividades celulares, e também, pelas características do indivíduo. Porém, internamente a célula também

existe o DNA mitocondrial, que pode apresentar resistência à digestão enzimática devido a sua estrutura circular, sendo desta forma a análise desse tipo de DNA excepcional no estudo de tecidos antigos e até arqueológicos, como ossos, dentes e cabelos¹².

Sendo assim, entende-se que, existem quatro grandes vantagens que devem ser citadas sobre a genotipagem molecular do DNA: 1) Possibilidade de extraí-lo de qualquer fonte de material biológico; 2) Possuir um alto potencial discriminatório; 3) Alta estabilidade química mesmo após um longo período de tempo, estando presente em todas as células nucleadas do organismo humano; 4) Possibilidade de separá-lo da célula espermática, de qualquer outro DNA celular⁹

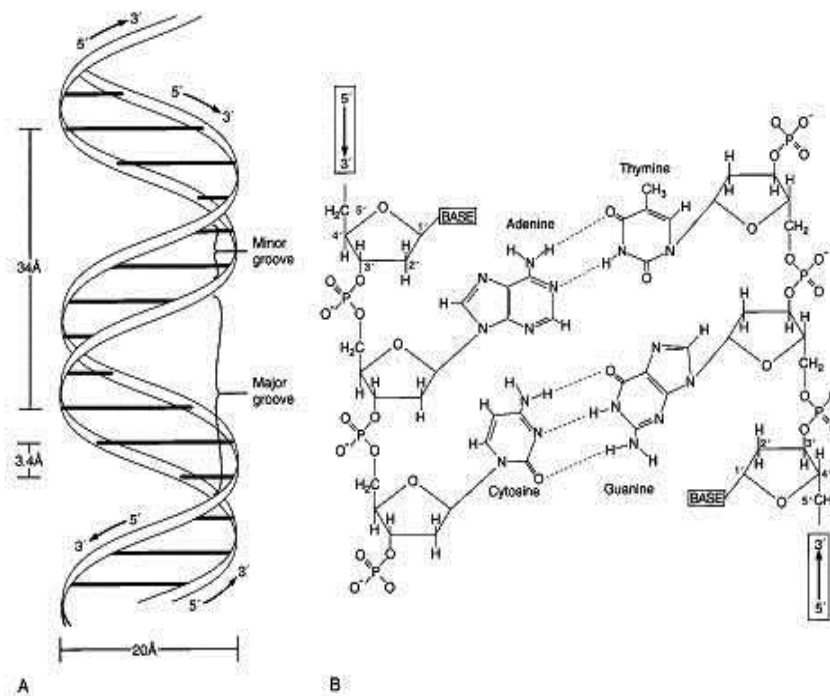


Figura 1: O DNA e sua estrutura, contendo Adenina, Guanina, Citosina e Timina como bases nitrogenadas. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

2 O uso do DNA em casos forenses

Em agosto de 1986, na Inglaterra, um caso criminal envolvendo o estupro e homicídio de duas adolescentes foi solucionado com a determinação da autoria do delito após toda a população masculina de dois vilarejos do condado de Leicester terem contribuído com a doação de amostras de sangue para confronto com vestígios de sêmen coletados do corpo das vítimas, porém, nenhum doador foi informado à verdadeira finalidade da coleta, o que pegou os criminosos de surpresa com o resultado das análises. Foi o primeiro caso solucionado com o uso da técnica descrito em literatura¹³.

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 coletadas em condições ideais^{6,14}.

O processo envolvendo a biologia molecular nas ciências forenses inclui: 1) coleta de amostras biológicas; 2) extração, purificação e quantificação do DNA; 3) análise dos *loci*; 4) visualização dos fragmentos e caracterização (com o uso da Eletroforese) e PCR Real Time; 5) interpretação e análise comparativa dos resultados²⁵.

Segundo Pena (2005)⁸, a determinação de identidade genética pelo DNA pode ser usada para demonstrar a culpabilidade dos criminosos, exonerar os inocentes, identificar corpos e restos humanos em desastres aéreos e em campos de batalha, determinar paternidade com confiabilidade incondicional, elucidar trocas de bebês em berçários e detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica.

Nos Estados Unidos, o FBI implantou em 1998 o CODIS (*Combined DNA Index System*), um banco de dados onde materiais genéticos são seqüenciados e guardados¹. No Brasil, o Projeto de Lei do Senado número 93 de 2011, prevê a implantação do mesmo sistema no país, sendo publicado no Diário Oficial da União em 29 de maio de 2012¹⁹.

O Sistema Codis consiste em um conjunto de quinze marcadores (18 marcadores padrão e 2 marcadores auxiliares) do tipo STR (recomendáveis para identificação humana por meio de análises de DNA), que foram padronizados para a identificação. O CODIS contém perfis genéticos de indivíduos condenados e os resultados de buscas em sua base de dados têm facilitado sobremaneira as investigações criminais²⁰. Entretanto, para serem considerados bons marcadores forenses, os STR devem ser providos de neutralidade, ou seja, não podem inferir características fenotípicas e/ou doenças, além de estarem presentes em regiões não-codificantes do genoma humano²¹.

Em conjunto, esses 20 marcadores apresentam probabilidade de repetição de aproximadamente $1,7 \times 10^{-15}$, sendo que o perfil composto pelos genótipos mais frequentes de cada um dos 13 marcadores apresenta uma probabilidade de ocorrência estimada em cerca de 1 em 160 bilhões²². Em termos práticos, esses valores asseguram que cada indivíduo da população mundial (exceto no caso de gêmeos idênticos), apresente um perfil de marcadores genéticos polimórficos exclusivos no que se refere aos 20 CODIS. Esses marcadores podem ser analisados simultaneamente em um procedimento laboratorial automatizado como o sequenciamento em tempo real, o que facilita sua aplicação forense até mesmo em situações nas quais a análise de um grande número de indivíduos é necessária²³.

Os principais marcadores STR utilizados pelo sistema CODIS são: TPOX (cromossomo 2), D3S1358 (cromossomo 3), FGA (cromossomo 4), D5S818 e CSF1PO (cromossomo 5), D7S820 (cromossomo 7), D8S1179 (cromossomo 8), TH01 (cromossomo 11), VWA (cromossomo 12), D13S317 (cromossomo 13), D16S539 (cromossomo 16), D18S51 (cromossomo 18), D21S11 (cromossomo 21), AMEL (cromossomo X) e AMEL (cromossomo Y)⁵⁸. Ao determinar as sequências dos 20 marcadores CODIS, é possível identificar um indivíduo através de uma comparação entre as amostras, tendo assim, um resultado que dificilmente pode ser questionado¹.

Locus	Panels/Kits						Location	Size, Mb
	13 Core loci	New FBI core loci ⁴	European loci ⁵	Identifiler	PowerPlex 16	China ⁶		
D1S1656		A	S				1q42	228.972
D2S441		A	S				2p14	68.214
D2S1338		A	D	√			2q35	218.705
D3S1358	√	A	S	√	√	√	3p21.31	45.543
FGA	√	A	S	√	√	√	4q28	155.866
D5S818	√	A		√	√	√	5q23.2	123.139
CSF1PO	√	A		√	√	√	5q33.1	149.436
D7S820	√	A		√	√	√	7q21.11	83.433
D8S1179	√	A	S	√	√	√	8q24.13	125.976
D10S1248		A	S				10q26.3	130.567
TH01	√	A	S	√	√		11p15.5	2.149
D12S391		A	S				12p13.2	12.215
VWA	√	A	S	√	√	√	12p13.31	5.963
D13S317	√	A		√	√	√	13q31.1	81.620
PentaE		A			√		15q26.2	95.175
D16S539	√	A	D	√	√	√	16q24.1	84.944
D18S51	√	A	S	√	√	√	18q21.33	59.100
D19S433		A	D	√			19q12	35.109
D21S11	√	A	S	√	√	√	21q21.1	19.476
DYS391		A					Yq11.21	14.103
TPOX	√	B		√	√		2p25.3	1.472
SE33		B	D				6q14	89.043
PentaD		B			√		21q22.3	43.880
D22S1045		B	S				22q12.3	35.779
Loci, n	13	20 + 4	12 + 4	15	15	11		

¹Amelogenin is not included.

Tabela 1: Os Loci STR utilizados pelo CODIS para diversos tipos de população, contendo os 20 padronizados, com exceção da Amelogenina. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314575/table/T1/>.

O marcador de DNA Mitocondrial (DNAmit) é utilizado quando o material biológico está muito danificado ou quando não é possível extrair DNA nuclear. Essa técnica consiste no sequenciamento de determinadas regiões de DNAmit, que variam de uma pessoa para outra e que são transmitidas pelas mães para os filhos. O DNAmit está presente em todas as células, tendo assim menor risco de degradação em relação ao DNA nuclear²⁴.

3 Procedimentos de coleta do material biológico para fins forenses

Nas investigações criminais, todas as amostras físicas e biológicas que não são coletadas, documentadas e preservadas da maneira adequada são consideradas ‘sem valor’ de prova, pois não permitem resultados concretos¹⁵.

Para fins forenses, o material biológico (em especial o DNA) deve ser coletado, acondicionado e manipulado com critérios rígidos e restritos para que em análises posteriores produza os resultados desejados e fidedignos. O método de coleta dependerá do estado e condição das amostras, devendo-se coletar uma quantidade significativa de material para que todos os testes sejam realizados¹⁶.

Dado a grande importância de coletar as amostras biológicas em condições adequadas para fins forenses são necessários materiais que além de caros, são também importados, o que pode em determinadas circunstâncias resultar em morosidade e dificuldade de acesso, daí a importância de preservar o material e usá-lo adequadamente ao fim propostos. Assim, o próprio perito ou a sua instituição podem produzir um “kit” de materiais para coleta, que são facilmente encontrados. O kit de coleta e preservação deve ser usado somente para essa finalidade, evitando assim contaminação do material^{15,16}.

Segundo Silva & Passos (2006)¹⁶, é muito importante que o perito esteja bem equipado, principalmente com uma maleta contendo suabes, pinças, luvas descartáveis, máscaras e toucas cirúrgicas, água destilada, envelopes juntamente com uma caixa térmica para transporte das amostras, seringas descartáveis, bisturi, fita adesiva e sacos plásticos.

Para cada tipo de material biológico com potencial uso forense, exige-se um tipo diferente de coleta. Quando se trata de fluídos (sangue, espermatozoides, saliva e outros), e este estiver em estado líquido e em pequenas quantidades, deverá ser coletado através de suabe estéril. Se for em quantidade maior usa-se uma seringa descartável estéril. Se o fluído estiver seco e em pequenos objetos ou roupas, os mesmos deverão ser encaminhados para análise, se estiver em grandes objetos ou em superfícies de metal, paredes ou móveis, deverão ser retirados utilizando-se bisturi ou espátula, ou ainda suabe umedecido com água estéril. Objetos que possam ser cortados utilizam-se tesoura e quando o fluído estiver em partes do corpo humano utilizam-se pinças para sua retirada¹⁵.

No caso do sangue líquido coletado recomenda-se que este seja preservado com anticoagulantes. Entretanto, deve-se atentar ao fato de que algumas das substâncias empregadas podem afetar a Reação em Cadeia da

Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* – PCR), que é uma etapa primordial em se tratando de análise de DNA. O EDTA (do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*) pode ser usado, desde que em concentrações indicadas para este fim¹⁷.

No caso das amostras serem compostas de tecidos (osso, pele, sangue, unhas, etc), órgãos, pêlos com bulbo capilar (raiz), estes devem ser documentados pela descrição ou fotografia. O material de coleta deve ser estéril e cada item deve ser acondicionado separadamente, selado e identificado¹⁶.

Para amostras de saliva, urina e outros fluidos corporais líquidos, estes devem ser envasados em recipientes neutros e estéreis. Deve-se manter este material acondicionado a frio e na ausência de luz¹⁶.

Caso se trate de manchas de fluidos corporais (sangue, sêmen, saliva, etc), faz-se a documentação e em seguida coleta-se parte do material biológico no qual este esteja aderido (por exemplo, lençol, vestes, etc.), ou quando se trata de objetos maiores ou metálicos coleta-se com utensílios apropriados, acondicionado as amostras em recipientes neutros e estéreis, tendo o cuidado de evitar contaminações¹⁶.

Um bom exemplo prático da coleta desses materiais biológicos aconteceu em 2004, em um incêndio no Supermercado *Ycua Bolãnos*, em Assunção, Paraguai, onde mais de 400 pessoas foram mortas no desastre. Peritos brasileiros auxiliaram nas coletas e identificação dos corpos. Ao mesmo tempo em que era realizada a identificação por meio dos métodos antropométricos, arcada dentária, radiografias e lesões cirúrgicas, os papiloscopistas realizavam a coleta e comparação de impressão digital. Mais da metade dos corpos foi identificado durante este processo. O restante apresentava um grau tão avançado de carbonização que somente seria possível identificar com o uso da análise de DNA⁶⁴.

Segundo Alonso (2005)⁶⁵, a coleta de amostras para o exame de DNA deve ser realizada logo após a identificação possível pelos médicos-legistas, odonto-legistas e papiloscopistas, mesmo quando esta identificação for positiva, pois pode ser necessário um futuro confronto genético para elucidação de dúvidas com relação a identidade do indivíduo e troca de corpos. No caso do supermercado de Assunção, graças aos exames de DNA que foram feitos mesmo nos cadáveres identificados, foi possível descobrir falsos positivos, fazendo com que várias exumações fossem realizadas⁶⁶.

Todo procedimento de coleta de material biológico para análise deve considerar preceitos de biossegurança padronizadas pela legislação e pelos programas de acreditação laboratorial, visando a proteção pessoal do perito e evitando o que se denomina de erro humano. Após a coleta e

acondicionamento apropriado dos materiais, estes devem ser encaminhados à laboratório credenciado e preparado para análise¹⁸.

4 Extração de DNA

O DNA pode ser extraído de amostras de sangue, de esfregaços bucais, de saliva, de osso, de dente, de tecidos e órgãos, de fios de cabelos, de sêmen, entre outros materiais biológicos²⁶.

A quantidade, a pureza e a integridade do DNA dependem de vários fatores, podendo ser influenciados pelas metodologias aplicadas para sua extração. Após a coleta do material biológico, o DNA da amostra deverá ser separado de outras substâncias celulares antes de ser examinado. Proteínas celulares, contaminações químicas e microbiológicas diminuem o poder discriminatório das análises utilizando o DNA²².

A escolha do uso de diferentes métodos de extração de DNA está relacionada ao tipo de material envolvido e influencia diretamente o resultado da análise dos STRs. A maioria dos procedimentos de extração de DNA compreende a lise celular, seguida da remoção das proteínas celulares precipitadas e por fim a precipitação do DNA com sua final eleição^{27,28}.

A extração orgânica, que é o método mais tradicional na genética forense, o qual consiste na remoção dos resíduos de proteínas do DNA através da combinação de dois solventes orgânicos diferentes: Fenol e Clorofórmio. Esse método como qualquer outro, possui suas indicações, vantagens e desvantagens. Entre as principais vantagens temos: o baixo custo e um alto grau de pureza do DNA a ser investigado. As desvantagens são: demora em sua execução e é um método altamente tóxico²⁷.

A extração de DNA de amostras de tecidos de mamíferos consiste basicamente 3 passos: digestão da amostra, extração do DNA com fenol e a purificação do DNA por meio de precipitação com etanol. Já para extração de DNA de amostras de sangue, podem ser usados diversos protocolos, como a extração de DNA com a utilização de colunas de extração; extração mediante precipitação com sal; ou a extração de DNA de amostras congeladas de sangue⁶⁹.

Para casos como o de estupros, onde a fonte de DNA é o sêmen, a EMBRAPA⁶⁹ sugere que o processo seja efetuado nos seguintes passos: a) Descongelar uma palheta de sêmen (cerca de 0,54 mL) e colocar em um microtubo de 1,5 mL. b) Centrifugar durante oito minutos a 16.000 g. c) Lavar o pellet quatro vezes em 1 mL de tampão PBS (a cada lavagem passar no vortex e centrifugar novamente). d) Ressuspender em 100 µL de tampão PBS (nesta fase, a amostra pode ser armazenada no freezer). Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de

DNA por meio da técnica de Reação em cadeia da polimerase 14 e) Adicionar 400 μL de tampão de lise 2 e incubar por trinta minutos a 50°C para dissolver o pellet. f) Adicionar solução de proteinase K a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 μg = 5 μL da solução de estoque de 20 mg/mL). Agitar no vortex até dissolver. Incubar por dezesseis horas a 50°C . g) Dividir as amostras em dois tubos, colocando 250 μL em cada tubo. h) Adicionar 80 μL de NaCl 5 M por tubo. Agitar vigorosamente por inversão. Centrifugar a 16.000 g por cinco minutos. i) Transferir o sobrenadante para tubos limpos. Acrescentar 1 mL de etanol absoluto a cada tubo e agitar por inversão. Centrifugar a 16.000 g por cinco minutos. j) Desprezar o sobrenadante. Acrescentar 100 μL de etanol a 70% a cada tubo (não agitar no vortex). k) Centrifugar a 16.000 g por cinco minutos. Desprezar o sobrenadante. Secar o pellet e suspender em 100 μL de tampão TE + enzima que atue sobre RNA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amostra). l) Incubar por uma hora em temperatura ambiente.

5 Marcadores moleculares

Estão distribuídos nos cromossomos autossomos e sexuais, são formados por regiões de repetições nucleotídicas sucessivas ou *in tandem*, de número variável, citadas como VNTRs (*Variable Number Tandem Repeats* ou Repetições Consecutivas de Número Variável) e STRs (*Short Tandem Repeats* ou Repetições Consecutivas Curtas)⁶. A utilização de técnicas de biologia molecular possibilitou uma verificação mais precisa da variação genética, analisando diretamente o genoma, tornando essa ferramenta capaz de proporcionar informações mais precisas que os antigos estudos com caracteres fenotípicos^{32,33,34,35}. Esses marcadores passaram a ser chamados de Marcadores Genéticos Moleculares³².

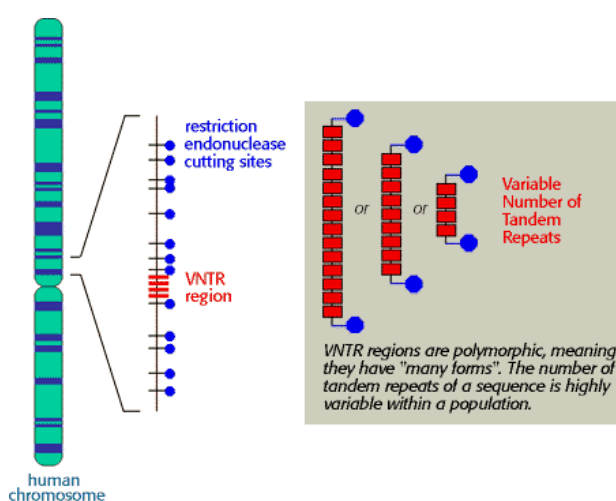


Figura 2: Exemplo de uma região VNTR. Disponível em: www.sciencebuddies.org.

Os marcadores moleculares foram aplicados inicialmente na ciência forense para identificação humana, elucidando na Inglaterra o primeiro caso criminal por meio da análise das variações de comprimento dos fragmentos de restrição, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), em regiões multilocais do DNA genômico³⁶. A mesma metodologia encontrou aplicação em diversas outras áreas, como por exemplo, o mapeamento genético^{36,37,38} e posterior diagnóstico de patologias¹.

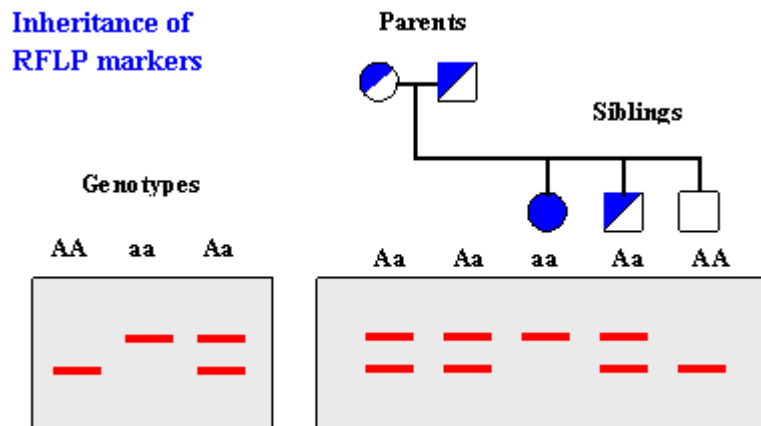


Figura 3: Exemplo da técnica usando os RFLP, onde é possível verificar a disponibilidade de indivíduos a doenças e também mapeamentos genéticos. Disponível em www.sciencebuddies.org.

Marcadores SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA (*Desoxiribonucleic Ácid* ou *Ácido Desoxiribonucleico*), ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenada⁴⁰. Os marcadores SNP são bi-alélicos, podendo ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergenéticos^{41,42}. Os polimorfismos ocorrem muitas vezes nas regiões codificadoras e promotora dos genes, que são responsáveis pelo fenótipo do indivíduo. Dessa forma, conjuntos específicos de SNPs presentes nesses genes se mostraram relevantes para a determinação de características físicas^{40,42}.

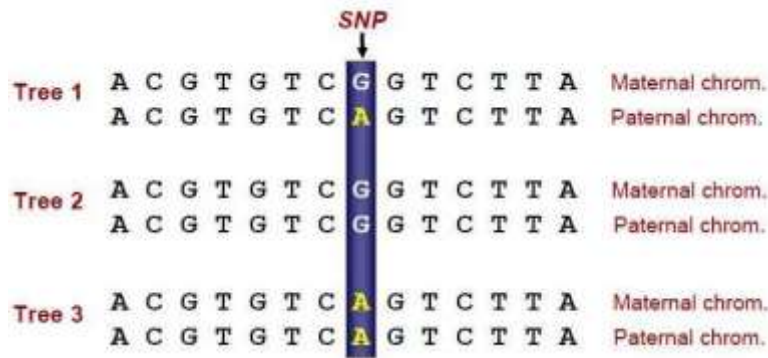


Figura 4: Demonstração de regiões SNP dentro de uma sequência de DNA. Disponível em www.sciencebuddies.org.

Variações genéticas detectáveis entre diferentes populações humanas foram verificadas e descritas em diversos trabalhos, corroborando que divergências populacionais em regiões geográficas diferentes são maiores que dentro de uma mesma região^{43,44,45}.

Os STRs são os mais utilizados não só na área de genética de populações, mas também na área forense, pois apresentam diversas características como: seu elevado polimorfismo⁴⁶, com grande variação entre os indivíduos⁴⁷ e, em menor grau entre populações⁴⁸. As regiões de STRs apresentam taxa de mutação mais alta por causa da sua principal característica, as repetições *in tandem*^{49,50}. Nessas regiões, a replicação tem maior probabilidade de sofrer um erro em decorrência de um processo denominado derrapagem da polimerase, que leva a inserção ou deleção de geralmente, uma unidade de repetição.

Os STRs são importantes para o trabalho de identificação humana e análises de sub-estruturação^{51,52}, mais do que inferências filogenéticas. Sua utilização exige um número grande de regiões, de modo a reduzir os efeitos das mutações recorrentes⁵³, aumentando seu poder de discriminação. Buttlar (2006)²², referencia que 3% do genoma humano são regiões STRs.

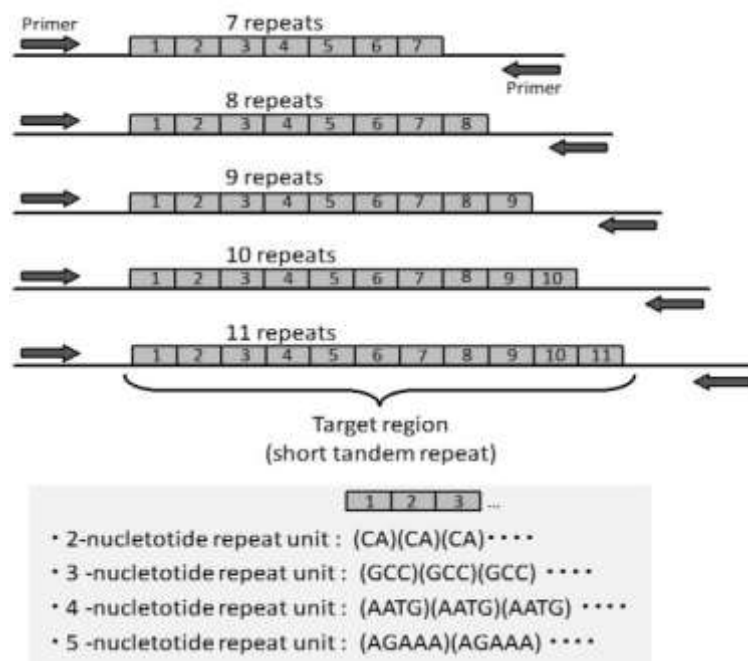


Figura 4: Exemplo de uma região STR. Disponível em: www.sciencebuddies.org.

6 Reação de Amplificação pela Polimerase – PCR e a quantificação do DNA

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^{54,55}. À análise dos STRs somaram-se os estudos dos polimorfismos do tipo Indels (inserção/deleção)⁵⁶ e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*)⁵⁷, utilizados hoje na identificação humana, genética de populações e outras aplicações.

A PCR consiste na amplificação seletiva de uma sequência-alvo de DNA específica a partir de uma coleção heterogênea de DNA, empregando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores que são complementares a uma certa extensão em ambas as fitas do DNA a ser amplificado. A sequência-alvo de DNA, cuja continuação é originalmente conhecida, é denominada DNA molde²⁹.

A enzima termoestável denominada DNA polimerase direciona o posicionamento dos precursores do DNA – dNTP – iniciando a síntese de novas fitas de DNA. Com um novo aumento de temperatura, a enzima DNA polimerase catalisa a reação, incorporando o nucleotídeo na posição

terminal ao iniciador, complementando as bases do DNA molde, promovendo a extensão da fita³⁰.

A reação de PCR é preparada utilizando-se diversos reagentes que devem possuir concentrações específicas para todo tipo de análise. Atualmente, existem diversos kits de PCR contendo todos os reagentes pré-padronizados que facilitam a utilização da PCR em laboratórios forenses²².

A quantificação do DNA após a sua extração é importante para o aperfeiçoamento da qualidade do produto de DNA resultante da PCR²⁷. O excesso de DNA em uma amostra de PCR poderá saturar a reação, fazendo com que apareçam artefatos de técnica e ampliações inespecíficas que podem dificultar a sua análise. Já a sua falta poderá acarretar a perda de um dos alelos, quando o indivíduo é heterozigoto, ou mesmo na sua não amplificação²².

A qualidade e quantidade de DNA devem ser examinadas após a extração, além de verificar a possibilidade de degradação. Quando se refere às amostras utilizadas em investigação criminal ou passíveis de degradação e contaminação, recomenda-se a utilização da quantificação de DNA humano³¹.

Segundo protocolo da Embrapa⁶⁹, todas as amostras de DNA obtidas em laboratório podem ser avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. O DNA absorve luz no comprimento de onda de 260nm e as proteínas, de 280nm. Diluições das amostras de DNA são preparadas com água ultrapura. Pequenas alíquotas de 10 µL (diluição 1:50) ou 5 µL (diluição 1:100) são misturadas com 490 ou 495 µL de água ultrapura, e lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda citados. Para estimar a concentração de DNA, utiliza-se a seguinte relação: 1 DO₂₆₀ = 50 µg de DNA de dupla hélice. A concentração de DNA na amostra pode ser obtida pelo seguinte cálculo:

$$\text{Concentração de DNA} = \text{leitura da DO}_{260} \times 50 \times \text{fator de diluição usado na leitura.}$$

A relação entre a quantidade de DNA e de proteína é usada como parâmetro para avaliação da qualidade do DNA extraído e, desse modo, a relação DO₂₆₀/DO₂₈₀ pode ser usada para esse fim. Amostras cujos valores dessa relação são inferiores a 1,8 apresentam contaminação com proteínas. O DNA pode ser quantificado e analisado quanto à sua qualidade, por meio da análise em gel de agarose. Para esse fim, um gel de agarose entre 0,8% e 1% é preparado e, com as amostras de DNA, é aplicada também uma amostra cuja concentração é conhecida. O DNA do

bacteriófago Lambda em concentrações conhecidas de 20, 50, 100 e 200 ng/ μ L é geralmente utilizado. Após a eletroforese, o gel é corado com brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta, e as amostras são comparadas aos padrões, determinando-se dessa maneira as concentrações aproximadas de DNA em cada amostra.

6.1 A qPCR (A reação em cadeira da polimerase em Tempo Real)

A PCR em tempo real (qPCR) é uma metodologia que permite a quantificação dos produtos de amplificação gênica em todas as fases de uma reação de PCR⁶⁰. Durante a qPCR, o acúmulo de amplificações é detectado em "tempo real", para cada ciclo da reação, por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas seqüência-específicas ou primers usados na reação⁵⁹.

O uso de transcrição reversa associada a PCR em tempo real tornou a quantificação de mRNA mais simples e precisa⁶¹. A PCR em tempo real requer uma plataforma de instrumentação que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para a excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação⁶². Várias tecnologias de qPCR estão disponíveis no mercado, que auxiliam em melhores resultados com custo inferior as das técnicas convencionais.

A q-PCR tenta localizar e quantificar o primer da amplificação da PCR através de um aumento correspondente fluorescência emitida, associada com a formação de produto durante cada ciclo da PCR. A quantificação é determinada durante a fase exponencial da PCR, quando o número de fragmentos amplificados são diretamente proporcionais ao número de primers introduzidos na amostra⁶⁸.

A quantificação do gene alvo durante a amplificação exponencial evita problemas que estão associadas com o chamado "ponto final" da PCR (Em que apenas são analisadas amplificações após a conclusão do ciclo final da PCR). Além disso, a q-PCR que utiliza a detecção baseada em fluorescência oferece maior sensibilidade e permite a discriminação do número de genes através de uma gama dinâmica mais ampla do que é encontrado com a técnica convencional da PCR⁶⁸.

Pelo fato do método convencional necessitar uma análise posterior a amplificação, para verificação da amostra, a q-PCR elimina essa etapa, introduzindo esses passos durante seu processo de amplificação, tornando-a mais eficiente.

7 Legislação relativa ao uso de técnicas moleculares na investigação forense no Brasil

Em 2011, um projeto de Lei do Senado número 93, prevê a implantação do Sistema CODIS no Brasil, sendo publicado no Diário Oficial da União em 29 de maio de 2012¹⁹. Segundo Silva e Gontijo (2010)¹⁸, o Brasil ainda não possuía uma legislação específica para análise e uso dos dados genéticos para fins forenses. Entretanto, há normas que tratam de provas periciais e as condições para que estas sejam aceitas devem cumprir uma séria de requisitos, serem conduzidas de maneira idônea e seguir protocolos específicos que garantam sua qualidade e legitimidade¹⁸.

No Brasil, o Código do Processo Penal (CPP) explica que a prova pericial deve ser conduzido da seguinte maneira:

“Art. 158. Quando a infração deixar vestígios será indispensável o exame de corpo de delito, direto ou indireto, não podendo supri-lo a confissão do acusado.

Art. 159. O exame de corpo de delito e outras perícias serão realizados por perito oficial, portador de diploma de curso superior.”

Quanto aos exames conduzidos em laboratório o CPP estabelece em seu Art. 170 que:

“Nas perícias de laboratório, os peritos guardarão material suficiente para eventualidade de nova perícia. Sempre que conveniente, os laudos serão ilustrados com provas fotográficas, ou microfotográficas, desenhos ou esquemas.”

O prazo para que os peritos confeccionem o laudo também é descrito na CPP em seu Art. 160:

“Os peritos elaborarão o laudo pericial, onde descreverão minuciosamente o que examinarem, e responderão as quesitos formulados.

Parágrafo único. O laudo pericial será elaborado no prazo máximo de 10 dias, podendo este prazo ser prorrogado, em casos excepcionais, a requerimento dos peritos.”

Na lei, não há artigos específicos que mencionam amostras biológicas e como tais devem ser tratadas. O Instituto Geral de Santa Catarina (IGP-SC) descreve a padronização utilizada pelo órgão em forma

de normativa, onde todos os peritos seguem o mesmo padrão fornecido pelo instituto, como por exemplo:

“Durante qualquer coleta de material biológico, bem como sua manipulação em qualquer fase do exame, é indispensável a utilização de luvas descartáveis, que deverão ser trocadas a cada amostra manipulada/coletada. Em locais de crimes, no interior dos laboratórios e, nas unidades do IML; o uso de máscaras, toucas, sapatilhas e jalecos é necessário; para que se evite contaminação exógena.”⁶⁷

O IGP-SC também descreve a forma de tratar as evidências relacionadas a locais de crime e instrumentos correlatos, como sangue, esperma e saliva (forma líquida), urina, fluidos líquidos impregnados em vestes ou em objetos, fluidos secos (sangue, esperma, urina, saliva e outros), pêlos e cabelos, fezes, vômitos, tecidos, órgãos, dentes e ossos, e também amostras post-mortem e em vítimas vivas (em casos de crimes sexuais).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os procedimentos analíticos utilizados para determinação de perfis genéticos em casos forenses sejam cíveis ou criminais, são totalmente dependentes do uso do DNA. As informações coletadas e armazenadas do DNA, como por exemplo as STR's e outras regiões, foram preponderantes em formar o Centro de identificação, Combined DNA Index System (CODIS), usado pelo Federal Bureau Investigation dos Estados Unidos da América (FBI-USA)^{32,33}, porém, no Brasil, a introdução do banco genético ainda não ocorreu.

Contudo, para que o DNA seja utilizado como prova no tribunal, o mesmo deve ser coletado e armazenado da forma correta, padronizada e previamente descrita, sendo que para isso, é necessário que os peritos cumpram as regras que descritas neste artigo, e utilizem materiais de qualidade¹.

Como já referenciado, a ausência de uma legislação específica capaz de padronizar os procedimentos de análise de amostras de DNA e o uso das técnicas moleculares, gera ainda inúmeros problemas, já que os laboratórios são relativamente novos e não há padrões definidos ou órgão responsável pela certificação, fiscalização e regulação dos laboratórios forenses¹⁸.

Sendo assim, sugere-se às autoridades do executivo e legislativo brasileiro de que é urgente a definição de leis que regulamentam os procedimentos adotados na coleta de material genético e seu armazenamento, padronizando protocolos para a extração e unificação do mesmo, definindo também os casos em que a obtenção deste material seja obrigatória.

Novos estudos na área forense se fazem necessários, averiguando os procedimentos adotados por peritos e laboratórios no Brasil, a fim de relacionar os erros frequentemente cometidos pelos mesmos à má qualidade das amostras finais.

REFERÊNCIAS

- 1 FRUEHWIRTH, M.; GUBERT, D.W.; MEURER, F.; DELAI, R.M.; PEREIRA, F.M. As doenças, síndromes e distúrbios associados ao braço (p) do cromossomo x podem influenciar a neutralidade dos marcadores forense? **Revista Forense**. 2013. v.417, p.178-212.
- 2 KOCH, A.; ANDRADE, Fabiana Michelsen de. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão; **RBAC**, 2008. v.40 ed.1, p.17-23.
- 3 BENECKE, M. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. **Naturwissenschaften**, 2002. v.84. pp.181-188.
- 4 BROWN, T.A. Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma introdução. 4.ed. Porto Alegre: **Artmed**. 2001. p.376.
- 5 DOREA, Luiz Eduardo Carvalho; STUMVOLL, Victor Paulo; QUINTELA, Victor. Tratado de Perícias Criminalísticas. 3. Ed. Campinas, SP: **Millenium Editora**, 2005.
- 6 KOBACHUK, L.D.G. **Estudo de frequências alélicas de dez locos STRs do cromossomo X na população do estado do Paraná e sua contribuição na identificação humana**. 2012.
- 7 KRUGLYA, L.; NICKERSON, D. Variation in the spice of life. **Nature Genetics**, 2001. v.27: p.234-236.
- 8 PENA, S. D.J. Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. In: Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas, 2005. v.20, p.447-460.
- 9 MALAGHINI, M.; ALONSO, C. A.M.; DALL’STELLA, R.; SCHNEIDER, V.J. Análises de Material Genético na Investigação Criminal – um relato sobre a evolução dos processos de padronização. Disponível em: http://www.labfa.com.br/texto_infmatgencriminal.htm [Acesso em 19-01-2014].
- 10 PRIMORAC, D.; SCHANFIELD, M. S. Application of Forensic DNA Testing in the Legal System. **Croatian Medical Journal**, 2000. v.41, n.1, p. 32-46.

- 11 ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: **Garland Science**; 2002.
- 12 WIEMANN, M; WINKLER, L; BINGMANN, D. Light microscopic methods to study cells on non-transparent materials. **Material wissenschaft und Werkstofftechnik**, 2001. v.32, ed.12, p.976–983.
- 13 LUFTIG, M. A., RICHEY, S. *DNA and Forensic Science*. New England. **Law Review**. 2001. v.35, p.3.
- 14 LIMA, R.B. *Biolixiviação de Concentrado de Flotação de Sulfetos de Cobre*. Orientadores: Prof^a. Dra. Selma Gomes Ferreira Leite e Prof. Dr. Luis Gonzaga Santos Sobral. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).
- 15 PARADELA, E.R.; GLIDEWELL, D.; KONOTOP, F.; CARVALHO, E.F.; CROUSE, C. **Feseability of Conducting DNA Analysis at Crime Scene**. Proceedings of 11th International Symposium on Human Identification [serial online] 2001. Disponível em: <http://www.promega.com> [Acesso em 12-01-2015].
- 16 SILVA, Luiz A. Ferreira; PASSOS, Nicholas Soares. **DNA Forense**. 2 edição. Ed. EDUFAL, 2006. p.86.
- 17 AZEVEDO, I.I. A aplicação da biologia forense na perícia criminal. Disponível em http://www.segurancacidade.org.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=65&limit=10&order=name&dir=ASC&Itemid=293 [Acesso em 18-02-2011].
- 18 SILVA, A.C.A.; GONTIJO, C.C. Acreditação, validação e verificação em práticas forenses. Disponível em www.cpgls.ucg.br/home/secao.asp?id_secao=3148 [Acesso em 13-02-2011].
- 19 SENADO. Portal Atividade Legislativa: Projetos e Matérias Legislativas. 2012. Disponível em: http://www.senado.gov.br/atividade/materia/detalhes.asp?p_cod_mate=99463 [Acesso em 10-04-2015].
- 20 PACHECO, A.C. Emprego de miniSTRs “non-CODIS” em amostras biológicas de DNA forense. **Instituto de Ciências Biomédicas**, USP. São Paulo, 2010.
- 21 DE TONI, E.C.; SAWITZKI, F.R.; SILVA, D.S.B.S.; MORO, T.; ALHO, C.S. Estudo do marcador forense D5S818 em relação ao SNP -260C>T. III **Cong. Bras. de Genét. Forense – II Jorn. Lati. Genét. Forense**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2011.
- 22 BUTLER J.M. *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Second edition, **Elsevier – Academic Press**, USA, 2005.
- 23 MARANO, L.A.; SIMÕES, A.L.; OLIVEIRA, S.F.; MENDES-JUNIOR, C.T. Polimorfismos genéticos e identificação humana: O DNA como prova forense. **Genética na Escola – SBG**. 2010. v.05 ed.1: p.53-56.
- 24 SANTOS, Ândrea K. C. R. dos; SANT’ANA, Andrea C.; ALVES, Alessandra P. P. *DNA Mitochondrial*. 2005. Disponível em:

www.seguranca.mt.gov.br/politec/3c/artigos/dna_mitocondrial.doc [Acesso em: 09-03-2015].

- 25 INTERNACIONAL CRIMINAL POLICE ORGANIZATION (INTERPOL). INTERPOL handbook on DNA data Exchange and practice. **Interpol**. 2009. Disponível em: [http://www.interpol.int/content/download/10460/74503/version/7/file/HandbookPublic2009\[2\].pdf](http://www.interpol.int/content/download/10460/74503/version/7/file/HandbookPublic2009[2].pdf) [Acesso em: 14-04-2015].
- 26 BRETTELL T. A.; BUTLER J. M.; SAFERSTEIN R. Forensic science. **Anal Chem**. 2005. pp. 60–38–39.
- 27 COMMITTEE ON DNA FORENSIC SCIENCE. The evaluation of forensic DNA evidence. **Washington: National Academy Press**, 1996.
- 28 HALLENBERG C.; MORLING N. A Group of the International Society for Forensic genetics. **Forensic Sci. Int.**, 2001. pp.23–33.
- 29 SAIKI R. K.; SCHARF S.; FALOONA F.; et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. 2001. pp.20: 230–1350–4.
- 30 SAMBROOK, J.; Molecular Cloning. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**: New York, 2001. 3.ed.
- 31 INTERNACIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS (ISFH). Recommendations of the DNA commission of the internacional society for forensic haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphism. **Forensic Sci. Int.**, 2002. p.55.
- 32 SALZANO, F.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M. South American Indians: a case study in evolution. **Research Monographs on Human Population Biology**. 6ª Ed. Oxford, 1986.
- 33 PÉREZ-LEZAUN, A.; CALAFELL, F.; MATEU, E.; COMAS, D.; RUIZ-PACHECO, R.; BETRANPETIT, J. Microsatellite variation and the differentiation of modern humans. **Hum Gen**. 1997. v.99: p.01- 07.
- 34 JORDE, L.B.; ROGERS, A.R.; BAMSHAD, M.; WATKINS, W.S.; KRAKOWIAK, P.; SUNG, S.; KERE, J.; HARPENDING, H.C. Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1997. v.94: p.3100-3103.
- 35 HUTZ, M.H.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; BORTOLINI, M.C.; SALZANO, F.M. Variability in nDNA, mtDNA, and proteins: a test case. **Genomic Diversity: Applications in Human Population Genetics**. **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, 1992. New York. p.23-32.
- 36 JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Individual-specific “fingerprints” of human DNA. **Nature**, 1985. v.316: p.76-79.
- 37 DONIS-KELLER, H.; GREEN, P.; HELMS, C.; CARTINHO, S.; WEIFFENBACH, B.; STEPHENS, K.; KEITH, T.P.; et al., A genetic linkage map of the human genome. **Cell**. 1987. v.51 ed.2: p.319-337.

- 38 TELENIOUS, H.; CLARK, J.; MARCUS, E.; ROYLE, N.; JAFFREYS, A.J.; PONDER, B.A.J.; MATHEW, C.G.P. Minisatellite DNA profiles: rapid sample identification in linkage analysis. **Hum. Hered.** 1990. v.40 ed.2: p.77-80.
- 39 SILVA, R.; MOURA0NETO, R.S. Allelic frequency distribution for three VNTR markers – D6S132, D7S467, D17S26 – in Rio de Janeiro population, Brazil. **Forensic Sci. Int.** 1998. v.94 ed.1-2: p.33-38.
- 40 RAMENSKY, V.; BORK, P.; SUNYAEV, S. Human non-synonymous SNPs: Server and survey. **Nucleic Acids Research.** 2002. v.30: p.3894-3900.
- 41 McCARROLL, S.A.; KURUVILLA, F.G.; KORN, J.M.; et al. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. **Nature Genetics.** 2008. v.40: p.1166-1174.
- 42 BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene.** 1999. v.234: p.177-186.
- 43 BOWCOCK, A.M.; KIDD, J.R.; MOUNTAIN, J.L.; HEBERT, J.M.; CAROTENUTO, L.; KIDD, K.K.; CAVALLI-SFORZA, L.L. Drift, admixture, and selection in human evolution: A study with DNA polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 1991. v.88: p.839-843.
- 44 TISHKOOFF, S.; KIDD, K. Implications of biogeography of human population for ‘race’ and medicine. **Nature Genetics Supplement**, 2004. v.11: p.21-27.
- 45 WITHERSPOON, D.J.; WOODING, S.; ROGERS, A.R.; MARCHANI, E.E.; WATKINS, W.S.; BATZER, M.A.; JORDE, L.B. Genetic Similarities Within and Between Human Populations. **Genetics**, 2007. v.176: p.351-359.
- 46 FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análise genética. **Brasilia, EMBRAPA/CENAGEN.** 1995. p.220.
- 47 LINS, A.M.; SPRENCHEER, C.J.; PUERS, C.; SCHUMM, W. Multiplex sets for the amplification of polymorphic sort tandem repeat loci – Silver stain and fluorescence detection. **BioTechniques**, 1996. v.20: p.882-889.
- 48 CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, 1994. v.371: p.215-220.
- 49 SANTOS, F.R.; TYLER-SMITH, C. Reading the human Y chromosome: the emerging DNA makers and human genetic history. **Braz. J. Genet.**, 1996. v.19 ed.4: p.665-670.
- 50 KAYSER, M.; ROEWER, L.; HEDMAN, M.; HENKE, L.; HENKE, J.; BRAUER, S.; KRÜGER, C.; KRAWCZAK, M.; NAGY, M.; DOBOSZ, T.; SZIBOR, R.; DE KNIJFF, P.; STONEKING, M.; SAJANTILA, A. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. **Am. J. Hum. Genet.** 2000. v.66 ed.5: p.1580-1588.
- 51 ROSENBERG, N.A.; LI, L.M.; WARD, R.; PRITCHARD, J.K. Informativeness of Genetic Markers for Inference of Ancestry. **Am. J. Hum. Genet.** 2003. v.73: p.1402-1422.

- 52 ROSENBERG, N.A.; PRITCHARD, J.K.; WEBER, J.L.; CANN, H.M.; KIDD, K.K.; ZHIVOTOVSKY, L.A.; FELDMAN, M.W. Genetic structure of human populations. **Science**, 2002. v.298 ed.5602: p.2381-2385.
- 53 BUDOWLE, B.; BROWN, B.L. El uso Del análisis de AND em La identificación forense. **Forénsica**, 2001. v.1 ed.1, p.09-22.
- 54 PENA, S.D.J.; CHABRADORTY, R. Paternity testing in the DNA era. **Trends in Genet**, 1994. v.10: p.204-209.
- 55 PENA, S.D.J.; JEFFREYS, A.J. Breve introdução às impressões digitais do DNA. **Ver. Bras. Genet**, 1993. v.16: p.857-879.
- 56 WEBER, J.L.; DAVID, D.; HEIL, J.; FAN, Y.; ZHAO, C.; MARTH, G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet**, 2002. v.71: p.854-862.
- 57 RAPLEY, R.; HARBRON, S. **Molecular Analysis and Genome Discovery**. Chichester. John Wiley & Sons Ltd. 2004.
- 58 FERREIRA, L.V. **Estimativa das frequências alélicas dos 15 marcadores autossômicos STR CODIS da população goianiense do Brasil Central**. Goiânia – GO, 2011.
- 59 FADERL S, HOCHHAUS A, HUGHES MD. Monitoring of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.** 2004. v.18, p.657-70.
- 60 GINZINGER DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**. 2002. v.30, p.503-12.
- 61 BARBANY G, HAGBERG A, OLSON-STRÖMBERG U, SIMONSSON B, SYVÄNEN AC, LANDEGREN U. Manifold-assisted reverse transcription-PCR with real-time detection for measurement of the BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia. **Clinical Chemistry**. 2000. v.46, ed.7, p.913-20.
- 62 NOVAIS CM, PIRES-ALVES M. PCR em Tempo Real. Rev. **Biotechnol. Ciên. Desenv.** 2004. p.33.
- 63 OLIVEIRA, V.E.C. **A investigação de paternidade no caso de pai gêmeo univitelino: Uma análise à luz dos direitos do menor investigante**. Tese de mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. 2009. Disponível em: http://www.biblioteca.pucminas.br/teses/Direito_OliveiraVE_1.pdf [Acesso em 21-04-2015].
- 64 BEZERRA, C. C. Metodologia de atuação pericial em desastre de massa - Relato do caso Paraguai. **Perícia Federal**. 2005. Ano VI, n.20, p.6-10.
- 65 ALONSO, A., MARTÍN, P., ALBARRÁN, C., GARCÍA, P., SIMÓN, L. F., ITURRALDE, M. J., FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ A., ATIENZA I., CAPILLA, J., GARCÍA-HIRSCHFELD, J., MARTÍNEZ, P., VALLEJO, G., GARCÍA, O., GARCÍA, E., REAL, P., ÁLVAREZ, D., LEÓN, A., SANCHO, M. Challenges of DNA Profiling in Mass Disaster Investigations, **Croatian Medical Journal** 2005. v.46, n.4, p.540-548.

- 66 MATTE, C.H.F.; Schwengber, S.P.; Carvalho, B.A. ; Raimann, P.E.; Leite, F.P.N. A Utilização da Análise de DNA em Desastres em Massa: Participação Brasileira na Identificação dos Corpos do Incêndio no Paraguai. **Revista do IGP**. 2007. Ano 3, n.3, p.3-6.
- 67 REGRAS para coleta, acondicionamento, preservação e encaminhamento de materiais biológicos para análise biológica. **Instituto Geral de Perícias**. Secretaria de Estado da Segurança Pública e Defesa do Cidadão. Estado de Santa Catarina. Disponível em:
http://www.igp.sc.gov.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=57&Itemid=82. [Acesso em: 22-04-2015].
- 68 CINDY J. SMITH, C.J.; OSBORN, A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiol Ecol**. 2009. v.67, p.6–20.
- 69 EMBRAPA Pecuária Sudeste. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Editora Embrapa**. 2007. São Carlos, SP. Disponível em:
<HTTP://www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacaogratis/e-books/LVFunDNA.pdf> [Acesso em 22-04-2015]