

A IMPORTÂNCIA DAS TÉCNICAS LABORATORIAIS NA ANÁLISE FORENSE

THE IMPORTANCE OF LABORATORY TECHNIQUES IN FORENSIC ANALYSIS

JULIANA DUARTE VALENÇA VAREJÃO¹, DEMERSON RUAN COELHO DE PAULA¹, FABIANA DA COSTA GOMES¹, KARINE MARCELINA RIBEIRO RANGEL¹, LUCAS D'LÚCIO SOUSA MORAES¹, NAYARA DOS REIS OLIVEIRA¹, LETÍCIA FRANÇA FIUZA BACELAR^{2*}

1. Acadêmicos do Curso de Biomedicina da Faculdade Única de Ipatinga; 2. Professora Mestre. Especialista em Educação Profissional na área da Enfermagem, em Saúde da Família, em Enfermagem do Trabalho. Docente dos cursos de Enfermagem, Farmácia e Biomedicina. Coordenadora do curso de Enfermagem da Faculdade Única de Ipatinga.

*Rua Salermo, 299, Bethânia, Ipatinga, Minas Gerais, Brasil. CEP: 35164-779. fiuzabacelar@gmail.com

Recebido em 19/11/2020. Aceito para publicação em 09/12/2020

RESUMO

O desenvolvimento técnico-científico de estudo do DNA possibilitou a elucidação de casos criminais que se encontravam sem apuração através do aperfeiçoamento de técnicas, os quais possuem a capacidade de amplificar quantidades limitadas de DNA encontradas em cenas de crimes, como a de PCR, Eletroforese e o Southern Blotting. Entretanto, de nada vale analisar as amostras coletadas se elas estiverem contaminadas. Para evitar o seguinte infortúnio é de responsabilidade dos profissionais atuantes tenham cautela no processo de coleta, transporte e armazenamento através da utilização de EPI's e a realização correta da metodologia das técnicas de análises. No Brasil, os seguintes informes adquiridos pós análises são encaminhados para o Banco Nacional de Perfil Genético onde ali serão armazenadas e através da Lei 12.654/2012 poderão ser utilizadas em julgamentos como prova. Este artigo de revisão de literatura descritiva tem como objetivo geral revisar as principais técnicas laboratoriais utilizadas na análise forense e consequentemente expor a importância da correta manipulação de material genéticos. Como objetivos específicos busca-se informar sobre o BNPG (Banco Nacional de Perfis Genéticos); Mencionar sucintamente sobre a implementação da lei 12.654/2012; Apontar os métodos adequados de coleta; Armazenamento e transporte do DNA da cena do crime até o laboratório; Elucidar as principais técnicas moleculares realizadas na investigação criminal.

PALAVRAS-CHAVE: DNA forense, PCR; Southern Blotting, Eletroforese.

ABSTRACT

The technical-scientific development of DNA study allowed the elucidation of criminal cases that were uncounted through the improvement of the following techniques, which have the capacity of amplifying limited amounts of DNA found in crime scenes, such as PCR, Electrophoresis and Southern Blotting. However, it is not worth analyzing the collected samples if they are contaminated. To avoid the following misfortune, it is the involved professional's responsibility to have cautions when it comes to the process of collecting, transporting and storing the samples with the use of PPE's and the performance of the correct methodology of the analysis techniques. In Brazil, the following reports acquired

after analysis are sent to the National Genetic Profile Bank where they will be stored and through Law 12.654/2012 it can be used in trials as evidence. This review article of descriptive literature has the general objective of reviewing the main laboratory techniques used in forensic analysis and consequently exposing the importance of correct handling of genetic material. As specific objectives it seeks to inform about: the BNPG (National Bank of Genetic Profiles), To mention briefly about the implementation of the law 12.654/2012, To point out the adequate methods of collection; Storage and transport of the DNA of the crime scene until the laboratory; To elucidate the main molecular techniques carried through in the criminal investigation.

KEYWORDS: Forensic DNA, PCR, Southern Blotting, Electrophoresis.

1. INTRODUÇÃO

Com informações que torna cada indivíduo único, o DNA possui fundamental importância para a vida. Cada célula viva reúne dados hereditários únicos que podem ser estudados e analisados. Na década de 1970 onde tecnologias de manipulação e análises do DNA revolucionaram o mundo da genética, acarretaram grandes avanços na área da pesquisa, permitindo cientistas a localizar e identificar os genes responsáveis por mutações, doenças e inclusive a descoberta de uma diferenciação de gene entre pessoas que transformou a ciência forense¹.

Alec Jeffrey, em 1985, ao estudar o gene da mioglobina, uma proteína responsável pela reserva de oxigênio dos músculos, notou que havia no gene regiões que distinguiam entre indivíduos. Para confirmar esta recente descoberta, este recolheu amostras sanguíneas dos membros de sua equipe, percebeu a presença dessas regiões por todo genoma e chamou-o de "impressão genética". Tal descoberta possibilitou o desfecho de diversos casos criminais anteriormente não solucionados por falta de provas, assim como, a confirmação de laços parentescos duvidosos².

Mediante aos avanços científicos sobre o DNA, no decorrer de décadas, tornou-se possível a criação e o aperfeiçoamento de técnicas moleculares específicas,

essenciais para a análise forense, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a Eletroforese e o Southern Blotting. O desenvolvimento dessas análises proporcionou exames mais sensíveis, seguros e eficazes, os quais auxiliaram nas análises, interpretações e testes confirmatórios das evidências coletadas em cenas de crime, ainda que em quantidade escassa³.

Todavia, o modo de execução adequado do método de coleta, armazenamento e transporte das amostras das cenas de crime, são de suma importância para a análise adequada, posto que qualquer contaminação exógena afeta substancialmente o resultado da análise laboratorial, podendo inocentar o criminoso ou incriminar o inocente⁴.

Juntamente com a importância de tais processos, adequa-se relevantemente o arquivamento dos informes contidos nas análises em um banco de dados denominado RIBPG (Rede Integrada do Banco de Perfis Genéticos). O qual permite a comparação dos materiais ali armazenados com a finalidade de auxiliar na apuração de casos autorizado pela lei 12.654/2012⁵.

Como objetivos específicos busca-se informar sobre o BNPG (Banco Nacional de Perfis Genéticos); mencionar sucintamente sobre a implementação da lei 12.654/2012; apontar os métodos adequados de coleta; Armazenamento e transporte do DNA da cena do crime até o laboratório; elucidar as principais técnicas moleculares realizadas na investigação criminal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo trata-se de uma revisão de literatura de caráter descritivo, onde foram realizadas buscas nas principais bases de dados de artigos científicos como Pubmed, Science Direct, Scielo, Scirus e Lilacs. A busca de artigos nestas bases de dados foi limitada na língua inglesa e portuguesa.

Por ser um assunto relativamente recente e de um amplo interesse, o período das publicações foi limitado de 2008 a 2019. Os termos utilizados na pesquisa foram: DNA forense, vestígios em cena de crime, técnicas de amplificação genética e banco de dados de perfil genético.

3. DESENVOLVIMENTO

Banco de perfis genéticos

As pesquisas genéticas forenses iniciaram em 1992, no Distrito Federal, através da união da Polícia Civil do estado (PCDF) com a Polícia Técnica os quais tinha como objetivo obterem um laboratório próprio e específico para o estudo da genética e análise forense. Em 1994 dois policiais, a convite do governo estadunidense, foram aos Estados Unidos realizar uma análise de uma amostra genética originária de dois crimes ocorridos em Brasília. O sucesso deste caso através da análise fez com que iniciasse um projeto de lei que implementaria os informes obtidos na elucidação de casos criminais⁶.

O armazenamento de material genético foi

primeiramente implantado com fins de persecução penal no Estados Unidos e no Reino Unido. Em 1998, nos EUA, foi liberado à agência Federação de Investigação (FBI) a aplicação do programa chamado CODIS (Combined DNA Index System). O seguinte programa possibilitou a comparação de amostras de perfis genéticos já existentes em um programa utilizado previamente, em 1994, denominado NDIS (National DNA Index System) o que resultou em uma cobertura ampla de dados por todo país. No Reino Unido, o NDNAD (UK National DNA Database) foi o banco implementado em 1994 o qual subsiste até os dias atuais⁷.

O Banco de Perfis Genéticos no Brasil foi implementado após a liberação da lei 12.654/2012 o qual permite que os informes obtidos pela análise forense sejam armazenados em um sistema de dados com o intuito de facilitar o compartilhamento de informações para uma ágil apuração dos casos criminais. Atualmente, no país, apenas se preserva informes de indivíduos por obrigatoriedade acusados de crimes hediondos ou por crime doloso e violento contra pessoa, ou pela autorização judicial. Tornando-o assim, bastante defasado quanto aos informes em comparação aos demais países⁸.

No Brasil, tal armazenamento está em constante discussão entre autoridades judiciais e a população comum, uma vez que, a maioria do público se nega a doar material genético espontaneamente por acreditar serem rotulados como criminoso. Ainda há um pequeno grupo que acha necessário ser de espécie universal para uma melhor identificação pessoal⁵.

Como argumento, a lei 12.654/2012, traz ao público uma garantia de que os informes contidos no sistema não têm possibilidade de revelar qualquer característica física do indivíduo, já que, é obtido pelas regiões não-codificantes do DNA⁵.

Métodos de coleta, transporte e armazenamento

A realização adequada do método de coleta, transporte e armazenamento do material genético encontrado na cena de crime é a etapa determinante para um resultado laboratorial íntegro, seguro e confiável. Caso haja uma falha em alguns dos processos pré-laboratoriais acima, ocasionando uma contaminação da amostra, há grandes chances de a análise laboratorial ser corrompida resultando em: resultados falso-positivo ou falso-negativo, possibilitando o julgamento errôneo do suspeito do crime. Há diversos tipos de amostras biológicas, entretanto, no presente trabalho será abordado apenas três principais: o sangue, esperma e saliva⁹.

Em certos crimes pode-se verificar a presença de sangue no corpo da vítima ou dos suspeitos, em superfícies e/ou em forma de manchas. Os métodos de coleta para cada situação acima são bastante semelhantes. Todavia, é importante salientar que a coleta irá variar dependendo do tipo de material genético encontrado e de sua localização. É importante

ênfatisar a necessidade de utilizar materiais limpos e estéreis no ato da coleta como, também, é necessário a utilização de EPI's dos profissionais que realizarão essa tarefa⁶.

Para a coleta do sangue que esteja em estado líquido, encontrado no corpo de uma pessoa ou em alguma superfície, é utilizado um swab para absorver o sangue presente. Caso o sangue encontrado esteja seco, utiliza-se o swab umidificado com água esterilizada. O processo de embalagem para o transporte é seguindo a mesma condição em ambos os casos, sendo necessário secar e embalar a coleta em envelopes ou papéis transparente com os cantos selados. O mesmo vale para as vestimentas ou móveis que apresentam algum tipo de mancha seja úmida ou seca. Caso contrário, e possível, pede-se a remoção ou o corte de parte do imóvel com o auxílio de um instrumento afiado limpo e este será embalado de forma que previna atritos que possa levar à uma perda de material genético¹⁰.

Podendo ser encontrado na vítima, peças íntimas e roupas de cama, o sêmen é considerado uma amostra rica em DNA e de demasiada importância na elucidação de casos que apresenta vítimas de abuso sexual. O procedimento de coleta depende do estado em que essa amostra se encontra. Se ela for encontrada em forma líquida, como em preservativos, o correto é amarrá-lo de maneira que não haja maior perda de material, em seguida, põe-se em recipiente sem risco de vazamento. Caso não encontre no preservativo, utiliza-se seringas, pipetas ou swab úmidos para a remoção da mesma. Em amostras secas o adequado é armazenar toda a peça encontrada em um saco plástico e acondicionada em local refrigerado. Na coleta deste tipo de amostra, é necessária uma cautela por parte do profissional em não armazenar peças onde o sêmen se encontra úmido, uma vez que, pode-se resultar no perder da amostra por interferência da proliferação de microrganismos⁴.

A saliva é uma das amostras mais descomplicado de se trabalhar quando se trata da facilidade de amplificar seu material genético, além de ser consideradas como uma das coletas mais simples. Podendo ser encontrado em pontas de cigarro, talheres, copos, garrafas e até no próprio corpo humano ao se tratar de uma lesão por mordida sua detecção pode ocorrer com auxílio de luzes ultravioleta. A coleta deste tipo de amostra deve ser realizada através de técnicas de esfregação permitindo a secagem em temperatura ambiente antes de armazenar em envelopes ou caixa de papel⁶.

Realizado a coleta, as amostras em estado líquido devem ser levadas ao laboratório o mais rápido possível de maneira que evite qualquer tipo de contaminação ou alteração biológica. O método de transporte dependerá do tipo de cada amostra, geralmente sendo realizado em veículos refrigerados, uma vez que as baixas temperaturas diminuem e/ou evitam qualquer possível fator de modificação, mantendo a integridade da amostra.

É importante ênfatisar que da mesma forma que os

profissionais que realizam a coleta tem a necessidade de utilizar EPI's, os motoristas de tais veículos também necessitam de utiliza-los por precaução, visto que, pode ocorrer algum incidente no caminho para o laboratório e este ter que tomar alguma providência⁴.

O armazenamento das amostras pode ser definido como o período em que estes ficarão no laboratório até a realização da análise. Por conta da alta demanda e, dependendo da região, poucos profissionais para a realização deste trabalho algumas amostras estão sujeitas a ficarem guardadas por longos períodos. As amostras de sangue e saliva são refrigeradas e não congeladas e é importante que fiquem longe de luz e umidade. As amostras de sêmen são necessárias manter congelados e do mesmo modo longe de luz e umidade. Tudo isso com o objetivo de preservar a integridade da amostra até serem analisadas¹⁰.

Técnicas laboratoriais na investigação forense

Em certas circunstâncias, podem ocorrer limitações quantitativas no que se refere a informação genética de uma amostra, o que obstaculiza a análise do material. No entanto, há uma técnica *in vitro* de biologia molecular bastante aplicada na análise forense a qual auxilia solução de tais problemas, denominada de reação em cadeia da polimerase (PCR). O seguinte método consiste em uma poderosa amplificação do DNA, dividida em três etapas, mediante a junção de cofatores necessários para o bom funcionamento das enzimas, proporcionando um resultado acelerado e direto, desde que haja uma sequência genômica completa¹¹.

Sabe-se que a interação entre as ligações de hidrogênio e os nucleotídeos é quem mantém a dupla fita do DNA unida. Entretanto, a técnica de PCR possibilita a segregação da mesma através da quebra dessas ligações resultando uma desnaturação da fita dupla de DNA.

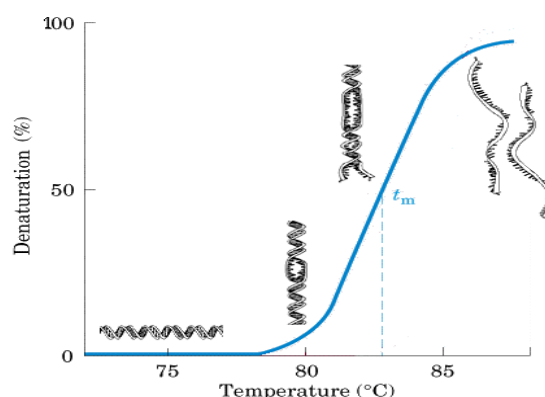


Figura 1. Acompanhamento do processo de desnaturação da fita dupla de DNA. **Fonte:** <http://www.ehu.es/biomoleculas/an/jpg/melt.gif>

A *desnaturação*, a primeira etapa do método, ocorre a partir do aquecimento lento da amostra trabalhada gerando, em determinado ponto do processo, a temperatura de melting (TM), o qual indica que metade da fita dupla se dissociou em fita simples. É importante ênfatisar que a TM pode ser afetada pela

concentração de sal da solução e/ou até por conteúdo nucleotídicos, pH e inclusive pelo comprimento da fita. A temperatura crescente amplia a porcentagem em que essa fita é desnaturada, como pode ser visto na imagem abaixo¹².

O TM dessa fita ocorreu entre 80° – 83°C manifestando o início do processo sendo necessário manter o aumento lento e progressivo da temperatura até a completa separação da fita. Ao findar esse processo inicial, é iniciada etapa do *anelamento*. Consiste basicamente na diminuição da temperatura, para cerca de 55°- 65°C, permitindo a ligação dos primers às suas sequências complementares da fita desnaturada de DNA. Os primers são enzimas que darão início a última fase da PCR, a *extensão do DNA*, permitindo que a DNA polimerase dê sequência à extensão a fita. Na seguinte fase, a DNA polimerase tipicamente utilizada é a *Taq* Polimerase, nomeado após a espécie bacteriana tolerante ao calor (*Thermus aquaticus*), onde haverá uma nova elevação de temperatura, aproximadamente 72°C, o qual auxilia no processo de fabricação das novas fitas de DNA. Justamente a estabilidade térmica da enzima é que a torna apta para a seguinte etapa¹³.

A eletroforese é uma técnica cuja finalidade é a separação de moléculas de DNA, de acordo com sua forma, massa e compactação, facilitando a visualização. As moléculas deslocam-se, em géis (agarose ou acrilamida) que agem como suporte por intermédio a ação de uma corrente elétrica o qual varia entre diferentes velocidades dependendo dos aspectos físicos da molécula analisada. Quando submetidos a um campo elétrico as moléculas de DNA migram para o polo positivo, pois são carregadas negativamente, e como força oposta a migração existe o atrito com suporte. Quanto maior a molécula, maior será o atrito e mais lenta sua migração. Conseqüentemente, moléculas de tamanhos divergente terão migrado à uma distância diferente após um determinado período de algum tempo¹⁴.

Na técnica, o gel funciona como filtro molecular no qual as moléculas de DNA são postas paralelamente ao campo elétrico. A distância que os fragmentos percorrem a partir do ponto de aplicação é comparada à distância que os outros fragmentos conhecidos percorrem o mesmo gel. A dificuldade de trespassar a matriz do gel em direção ao polo positivo é contrariamente proporcional ao tamanho de cada fragmento, sendo que, as moléculas menores tendem a migrar com mais facilidade e rapidez¹⁵.

A eletroforese Capilar é bastante utilizada na análise de DNA forense, visto que, permite a efetuação de numerosas quantidades de amostras, através de uma limitada quantia, de maneira automatizada. Entretanto, mesmo sendo técnicas versáteis e de fácil aplicação, a eletroforese convencional possui a desvantagem de identificar apenas quanto ao tamanho dos fragmentos e não as seqüências que os formam³.

O *Southern Blotting* é um método eficaz para a identificação de seqüências específicas de DNA, por

meio da técnica de hibridização. Que utiliza a eletroforese em gel de agarose, para separar os fragmentos, que surgiram através da clivagem do DNA com uma enzima de restrição. Após a eletroforese, ocorre a imersão de gel em uma solução contendo hidróxido de sódio, esse ato possibilitará uma desnaturação dos fragmentos de DNA. Este gel será coberto por um papel de nitrocelulose e uma camada grossa de papel toalha, por capilaridade, as moléculas serão deslocadas para a nitrocelulose e o DNA de fita simples se liga na mesma posição que se encontra o gel, resultando, há sim uma réplica idêntica do mesmo¹⁶.

Para que ocorra a fixação do DNA é preciso esperar a eletroforese em gel secar, numa temperatura de 80° C, após a sua secagem, será colocada uma solução de uma seqüência conhecida de DNA, na membrana de nitrocelulose. Esse procedimento será útil na identificação de regiões polimórficas de um determinado indivíduo¹⁷.

A medicina forense utiliza esse método para identificar suspeitos e, também, em testes de paternidade, através da identificação de polimorfismos, chamado de RFLP ou polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição. Usando uma sonda são obtidos os padrões de RFLP de uma região de DNA, que são aproveitados em uma impressão digital do DNA, permitindo que haja uma distinção entre dois indivíduos quaisquer¹⁶.

4. DISCUSSÃO

Definitivamente há uma grande seriedade nas conseqüências acarretadas por uma análise contaminada, uma vez que, é uma parte determinante na persecução penal. Sendo assim, o profissional da área laboratorial, independentemente de ser de análise clínica ou forense, necessita de prudência ao manipular qualquer material biológico encontrado de maneira que não seja contaminada possibilitando um resultado confiável e verdadeiro.

Quanto as análises laboratoriais citadas durante o presente trabalho, enfatizamos que estes são correlacionados entre si na respectiva seqüência para a obtenção do resultado da análise. Entretanto, a negligência dos profissionais coletores e analistas pode interferir diretamente no resultado da análise o que pode se estender a um julgamento equivocado.

5. CONCLUSÃO

Embora é notório o avanço na área da análise forense, o que busca resultados em exames mais específicos, sensíveis e eficazes, ainda nota-se alguns casos de atos negligentes por partes dos profissionais, que resulta na possível contaminação da amostra, que é inaceitável uma vez que pode prejudicar a vida de um inocente, interferindo diretamente em sua vida profissional, social e pessoal. Sendo assim, a correta manipulação de materiais genéticos e utilização de técnicas laboratoriais adequadas auxiliam na elucidação de crimes. O banco de dados possui grande

importância no processo de persecução penal, uma vez que, tal armazenamento pode ser essencial em uma futura elucidação de caso.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Araújo MC *et al.* O DNA como ferramenta de identificação humana e a sua importância no trabalho da perícia criminal. 2018.
- [2] Bernath V, El ADN como herramienta para la resolución de procesos judiciales. Pasado, presente y futuro. *Química Viva*. 2008; 7(2):103-112.
- [3] Alves ACL, De Oliveira FE. A importância das técnicas moleculares na investigação forense. *Mostra Científica em Biomedicina* 2019; 3(2).
- [4] Sousa JM, Queiroz PRM. Coleta e preservação de vestígios biológicos para análises criminais por DNA. *Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde*. 2015; 16(2).
- [5] Relatório Da Rede Integrada De Bancos De Peris Genéticos (Ribpg). 7th ed. Brasília: 2018. [Acesso: 03 out. 2020]. Disponível em: <https://aspecgo.com.br/wp-content/uploads/2018/09/VIII-RELAT%C3%93RIO-DA-REDE-INTEGRADA-DE-BANCOS-DE-PERFIS-GEN%C3%89TICOS-RIBPG-final.pdf>.
- [6] Nascimento AC. DNA Forense e a coleta de vestígios em locais de crime. *Revista especialize*. 2017; 1:1-6.
- [7] Grazinoli GR, Leal RE. O Banco de Perfis Genéticos Brasileiro Três Anos após a Lei nº 12.654. *Rev. Bioética y Derecho*. 2015; 35 94-107.
- [8] Garrido RG, De Almeida BC. Privacidade à toda prova: percepções de brasileiros sobre o banco nacional de perfis genéticos. *Inter-scienceplace*. 2019; 13(4).
- [9] Monteiro IVP. "Vestígios hemáticos no local de crime-Sua importância médico-legal" [tese] Porto: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto; 2011.
- [10] FBI. Handbook of Forensic services. Revisado em 2016. [Acesso: 16 mai. 2019]. Disponível: <https://www.fbi.gov/file-repository/handbook-of-forensic-services-pdf.pdf>.
- [11] ALBERTS B *et al.* Biologia molecular da célula. Artmed Editora 2017. 6th ed. 473.
- [12] Li R. Forensic biology. 2^a ed. New York: CRC Press. 2015.
- [13] Santos EA, Sternberg C, Almeida RT. Influência da temperatura ambiente na análise do termociclador. In: XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica CBEB. 2014.
- [14] Westermeier R. Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. John Wiley & Sons. 2016.
- [15] Silva TA, Frangiosa PC. A aplicação de técnicas moleculares de DNA na investigação forense. *Revista Científica UMC*. 2018; 3(2).
- [16] Zaha A. Biologia Molecular Básica. 5th ed. Porto Alegre: Artmed. 2014; 403.
- [17] Da Silva Júnior JR, Sousa VET. Marcadores moleculares: um enfoque forense. *Acta de ciências e saúde*. 2016; 1(1):1-22.