

UTILIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ANÁLISES FORENSES

Luciana Otero Lima

O exame de DNA com fins de determinação de identidade genética constitui uma das ferramentas mais revolucionárias da moderna genética molecular humana. A necessidade de se determinar paternidade com confiabilidade e de se resolver casos criminais envolvendo estupro, homicídio, rapto, troca ou abandono de crianças, além de identificar corpos e restos humanos em desastres ou campos de batalha, fez com que a identidade genética se tornasse, nos últimos 20 anos, uma ferramenta indispensável em investigação criminal.

A determinação de identidade genética pelo DNA é uma técnica muito superior a todas as técnicas preexistentes de medicina forense, inclusive às impressões digitais clássicas. Obviamente o DNA não pode por si só provar a culpabilidade criminal de uma pessoa ou inocentá-la, mas pode estabelecer uma conexão irrefutável entre esta pessoa e a cena do crime. Atualmente os resultados da determinação de identificação genética pelo DNA já são rotineiramente aceitos em processos judiciais em todo o mundo.

A análise de amostras biológicas como provas forenses teve seu início no século XX utilizando-se os grupos sanguíneos ABO, seguidos pela utilização do complexo HLA (*Histocompatibility Leucocyte Antigen*). Apenas em 1985 a tipagem molecular do material genético foi utilizada oficialmente pela primeira vez, na Inglaterra.

Hoje, são utilizados vários locos diferentes na investigação por análise de DNA, os quais são altamente polimórficos. Por isso, e pelos avanços nas áreas de Biologia Molecular e Estatística Populacional, a tipagem de polimorfismos humanos em nível de DNA é hoje o método mais sensível, específico e informativo para a identificação humana, tornando-se um elemento crucial na elucidação de casos forenses, uma vez que nos permite construir um perfil genético indivíduo-específico.

Existem várias técnicas para extração do DNA, que utilizam diferentes metodologias e espécimes biológicos. O sangue é o padrão-ouro de material utilizado para extração de DNA porque é fonte abundante de informação genética e por fornecer DNA íntegro e de boa qualidade para análise, já que provê uma amostra biológica fresca. No entanto, muitos outros materiais podem ser efetivamente analisados: células epiteliais da mucosa oral; unhas, pêlos e fios de cabelo (região do bulbo capilar); manchas de material biológico (líquido seminal, urina, saliva) em vidro, facas e tecidos; ossos carbonizados, ossadas ou dentes; esfregaços anal, vaginal e bucal; tecidos derivados de biópsias ou cirurgias, tecidos mumificados e congelados; líquido amniótico; e, mais recentemente, células deixadas por impressão digital. A possibilidade de se obter DNA de células da mucosa bucal (presentes na saliva) é muito útil, pois tais células costumam ser encontradas em pontas de cigarro (no papel que cobre o filtro), selos e envelopes (na cola, se esta tiver sido lambida), gomas de mascar, copos, restos de comida e tampas de canetas mordidas, ampliando muito a gama de amostras possíveis.

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 colhidas em condições ideais: sem contaminação e com material genético íntegro. Já na determinação de identidade, o material obtido nem sempre está em boas condições: às vezes há pouco DNA, ou este está contaminado ou degradado. Nesses casos, a extração de DNA adequado para a análise talvez seja a etapa mais importante do processo.

Após a extração do DNA presente no material em questão, segue-se a análise dos polimorfismos genéticos. Nos últimos anos foram desenvolvidas diversas técnicas para estudo de diferentes tipos de polimorfismos de DNA, formando assim um verdadeiro cardápio, no qual os cientistas e laboratórios podem escolher o método mais adequado para solucionar o problema em mãos. Aliás, por isto, a expressão correta é “teste em DNA” e não “teste de DNA”.

O método mais usado hoje em dia, é o estudo de regiões repetitivas de DNA chamadas de minissatélites (VNTRs) e microssatélites (STRs). A chave da diversidade nestas regiões é que o número de repetições de uma dada seqüência de bases, que pode ser de 1 a 4 bases nos STRs e de 10 a 100 bases nos VNTRs, varia entre indivíduos. Assim, em função da quantidade de repetições presentes, cada indivíduo terá um tamanho diferente para a região do DNA que contém um dado STR ou VNTR. Cada possibilidade de tamanho (ou de número de repetições) que pode ser encontrada para representa um alelo. Tais diferenças podem ser estudadas ou com sondas de DNA ou com a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Além dos micro e minissatélites, análises de polimorfismos presentes no DNA mitocondrial e no cromossomo Y são usadas em algumas ocasiões. Mais recentemente, os abundantes polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e os polimorfismos de inserção/deleção (indels) têm emergido como possíveis alternativas.

MINISSATÉLITES ESTUDADOS COM SONDAS MULTILOCAIS

Princípio da técnica: A existência dos vários alelos possíveis para um dado minissatélite presente no genoma faz com que fragmentos de tamanhos diferentes sejam gerados ao se isolar a região que contém tal polimorfismo. Porém, os fragmentos correspondentes a estas regiões de VNTR são, em geral, grandes, não podendo ser analisados por PCR (adequado para fragmentos menores de 1000pb). Desta maneira, a análise de minissatélites para determinação de identidade genética baseia-se em duas outras técnicas moleculares: clivagem com endonucleases de restrição e *Southern blotting* (<http://www.dnalc.org/shockwave/southan.html>). Inicialmente, as amostras de DNA a serem analisadas são clivadas (cortadas) com uma determinada enzima de restrição, que reconhece sítios presentes ao redor da região do VNTR. A clivagem gera fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com o número de repetições presentes no VNTR, os quais, por serem geralmente muito grandes (centenas a milhares de pares de bases), não conseguem ser visualizados diretamente no gel após a separação eletroforética (observa-se apenas grandes arrastes de DNA). A distinção das bandas de cada amostra de DNA, que correspondem aos alelos diferentes alelos possíveis para um dado VNTR, é feita então pelo *Southern blotting*: as amostras são hibridizadas com uma sonda radioativa (molécula de DNA fita simples, complementar à região do VNTR em questão e marcada radioativamente), e o sistema é exposto a um filme de raio X, o qual, após revelado, mostra o padrão de bandas que cada indivíduo investigado possui para o VNTR que foi analisado. Após este procedimento, pode-se, então, comparar as amostras (<http://www.dnai.org/d/index.html>).

Resumindo: pessoas diferentes possuem um padrão de bandas diferentes por possuírem alelos de minissatélites de tamanhos diferentes.

Sobre a técnica: Essa técnica é a mais antiga desenvolvida para esses fins e, aos poucos, vem sendo substituída por tecnologias mais recentes e sofisticadas. Apesar de seu custo relativamente baixo, existem várias dificuldades inerentes à técnica visto que utiliza material radioativo e é extremamente trabalhosa. Além disso, o DNA a ser analisado deve

estar em uma quantidade suficiente e não degradada, para que a endonuclease possa cumprir seu papel perfeitamente.

MICROSSATÉLITES ESTUDADOS COM PCR

Princípio da técnica: A existência de vários alelos possíveis para determinado microssatélite presente no genoma faz com que fragmentos de tamanhos diferentes sejam gerados quando submetemos a amostra de DNA a ser analisada a uma reação de PCR utilizando-se *primers* que flanqueiam essas regiões de repetição. O produto dessa reação pode, então, ser analisado por:

- **Separação eletroforética em gel de poliacrilamida:** para que possamos usar a técnica dessa maneira, cada região de microssatélite a ser analisada deve ser amplificada em uma reação de PCR diferente. Uma vez que várias regiões de microssatélites devem ser investigadas para que se tenha um alto grau de certeza em uma análise forense, muitas reações de PCR precisam ser realizadas, sendo cada uma delas analisada em uma separação eletroforética diferente, com posterior compilação dos dados. Isso é necessário porque a leitura “manual” de um gel de microssatélite ficaria muito comprometida com a inclusão de vários sistemas em um mesmo gel, uma vez que as bandas de diferentes sistemas poderiam ser confundidas facilmente, dificultando a interpretação dos resultados.

- **Seqüenciamento automatizado:** essa metodologia é muito mais sensível que a anterior, além de permitir que todos os locos de microssatélites a serem analisados sejam amplificados em uma mesma reação de PCR (PCR multiplex). Neste caso, cada par de *primers* (específico para cada sistema de microssatélite) é marcado com fluorescência em cores diferentes; assim, os alelos de cada microssatélite investigado podem ser reconhecidos por sinais fluorescentes diferentes. Uma alternativa à eletroforese com gel plano é o sistema que usa um capilar por onde migram fragmentos marcados com radicais fluorescentes. Quando os fragmentos passam por um laser, são registrados em gráficos, sob a forma de picos. Tal sistema é próprio dos equipamentos utilizados nesta técnica (i.e., seqüenciadores automáticos). Picos em pontos diferentes do gráfico e em cores diferentes correspondem aos alelos dos vários sistemas polimórficos investigados. A comparação das posições dos picos obtidos de uma amostra com os obtidos em outra pode elucidar o caso em questão.

Sobre a técnica: Essa técnica tem algumas vantagens sobre a de minissatélites estudados com sondas:

- como o DNA é amplificado, a amostra a ser analisada pode ter uma quantidade inicial muito menor dessa molécula;
- mesmo existindo contaminação da amostra por DNA de outras espécies (bactérias, fungos, ...), a técnica de PCR é específica o suficiente para amplificar apenas DNA humano.

Até outubro de 2000, a polícia federal norte-americana (FBI) usava 13 locos de microssatélites – e mais dois, que geram padrões distintos para homens e mulheres, para determinar o sexo – para obter e arquivar os perfis genéticos de criminosos. Esse número de locos analisados, que era recomendado pelo FBI e seguido por todos, será aumentado em breve para 16, para que os índices de identidade ou paternidade obtidos sejam maiores em valor absoluto.

DNA MITOCONDRIAL e CROMOSSOMO Y

Seqüências localizadas nestas regiões são polimórficas e tendem a ser transmitidas para a geração seguinte intactas, já que não sofrem recombinação, ou esta é reduzida. Esta estratégia é utilizada quando se deseja investigar a linhagem parental de um indivíduo ou mesmo de uma população (estudos evolutivos). Uma vez que o DNA mitocondrial é transmitido apenas pela linhagem materna (somente a mãe transmite DNA mitocondrial para todos os filhos e filhas) e o cromossomo Y é transmitido pelo pai somente para os filhos homens, a análise destas regiões pode fornecer importante informação quanto à origem parental dos indivíduos, embora não forneça informação indivíduo-específica.

- DNA MITOCONDRIAL

Princípio da técnica: Após extração do DNA mitocondrial (mtDNA), ele é submetido a uma reação de PCR utilizando primers que flanqueiam regiões polimórficas específicas deste DNA. Após a amplificação, o resultado é analisado por seqüenciamento. A diferença desse seqüenciamento para o realizado na análise de microssatélite é que, enquanto o de microssatélite nos permite verificar alelos diferentes (utiliza-se primers marcados com fluorescência), no de mtDNA, lê-se os nucleotídeos da região amplificada (os nucleotídeos usados no PCR é que são marcados com fluorescência). Após o seqüenciamento, faz-se as comparações necessárias.

Sobre a técnica: No contexto da análise forense, o interesse pelo mtDNA surgiu por vários motivos, entre eles: a taxa mutacional é 5 a 10 vezes maior que a do DNA nuclear, uma vez que a existência de poucos mecanismos de reparo permite que as variações nos nucleotídeos sejam acumuladas; esse DNA é mais resistente à degradação que o DNA nuclear. Assim, em grandes desastres (incêndios, explosões, queda de aviões, ...), quando é mais difícil identificar os corpos, analisa-se o mtDNA e compara-se com seqüências obtidas de possíveis irmãos ou ascendentes maternos.

Utiliza-se mtDNA quando a amostra em questão tem uma quantidade pequena ou não tem DNA nuclear; como, por exemplo, quando a única amostra que temos do possível criminoso é um pêlo ou cabelo sem bulbo. A técnica também pode ser usada quando se quer fazer um exame de maternidade e não se tem o pai.

- MICROSSATÉLITE DE CROMOSSOMO Y COM PCR

Princípio da técnica: A técnica é realizada da mesma forma com que realiza-se a análise de microssatélite por PCR, utilizando-se o seqüenciamento (PCR com *primers* marcados).

Sobre a técnica: Além das aplicações já citadas, a análise de microssatélites existentes no cromossomo Y (crY) tem sido utilizada para elucidar casos de estupro onde se tem mistura de material biológico e, por isso, de DNA. Além disso, pode-se realizar teste de paternidade sem a mãe.

No cromossomo Y existem 3 regiões distintas. Duas pequenas regiões são homólogas ao cromossomo X e podem sofrer recombinação. No entanto, há uma parte do cromossomo Y que é exclusiva e que não sofre recombinação com o cromossomo X e por isso é passada de pai pra filho sem sofrer qualquer alteração. Mutações nesta região do cromossomo Y podem acontecer, mas é um evento raro. Por isso, indivíduos masculinos de uma mesma família apresentam o mesmo padrão de DNA nesta região do cromossomo Y, enquanto indivíduos não relacionados geneticamente apresentam padrões diferentes.

Enquanto que no estudo de microssatélite de DNA de cromossomos somáticos um mesmo indivíduo pode possuir dois alelos, diferentes ou não, para a mesma região (o que significa homo ou heterozigidade), no estudo de microssatélite de crY, cada homem possui apenas um alelo, uma vez que possui apenas um crY.

POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNPS) E OS POLIMORFISMOS DE INSERÇÃO/DELEÇÃO (INDELS)

Essas técnicas são mais recentes e sofisticadas, porém ainda em fase de implementação. A grande vantagem sobre os microssatélites é que podem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos (50pb ou menos), sendo muito úteis quando se tem DNA muito degradado (por exemplo, quando a amostra disponível é um cadáver em estado avançado de decomposição ou carbanizado).