



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

LUCIANA MAIA ESCHER DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PERFIL MOLECULAR DE VESTÍGIOS SANGUÍNEOS
PROVENIENTES DE LOCAIS DE CRIME APÓS APLICAÇÃO DE REAGENTE
QUIMIOLUMINESCENTE**

Dissertação de Mestrado

Goiânia
2013

LUCIANA MAIA ESCHER DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PERFIL MOLECULAR DE VESTÍGIOS SANGUÍNEOS
PROVENIENTES DE LOCAIS DE CRIME APÓS APLICAÇÃO DE REAGENTE
QUIMIOLUMINESCENTE**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Genética da Pontifícia
Universidade Católica de Goiás como
requisito parcial para obtenção do Título
de Mestre em Genética

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane da Silva Sena Barcelos

Goiânia
2013

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Santos, Luciana Maia Escher.

S237a Análise do perfil molecular de vestígios sanguíneos
provenientes de locais de crime após aplicação de reagente
quimioluminescente [manuscrito] / Luciana Maia Escher dos
Santos – 2013.

124 f.; il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, Mestrado em Genética, Goiânia, 2013.

“Orientadora: Profa. Dra. Rejane da Silva Sena Barcelos”.

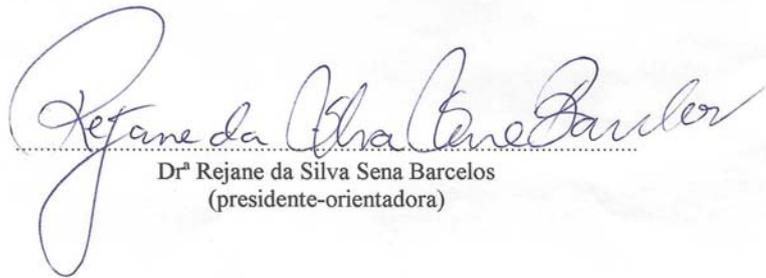
1. Biologia molecular. 2. Sangue - Análise. 3. Genética legal.
I. Barcelos, Rejane da Silva Sena. II. Título.

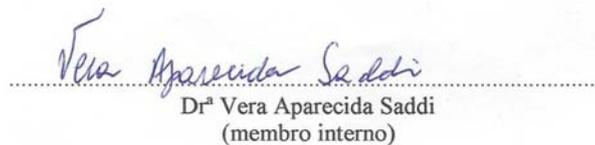
CDU 343.983.2(043)

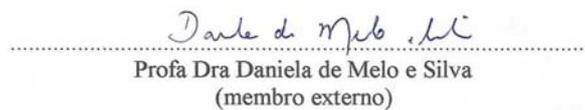
ATA COMPLEMENTAR Nº 77/2013

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DISCENTE: LUCIANA MARIA ESCHER DOS SANTOS
DEFENDIDA EM 24 DE JUNHO DE 2013 E _____ COM CONCEITO A

BANCA EXAMINADORA


.....
Dr^a Rejane da Silva Sena Barcelos
(presidente-orientadora)


.....
Dr^a Vera Aparecida Saddi
(membro interno)


.....
Profa Dra Daniela de Melo e Silva
(membro externo)

Isac Newton, em uma de suas citações, disse:

“ Se eu vi mais longe, se eu cheguei até aqui....foi porque me apoiei em ombro de gigante”

Ao meu pai, meu gigante.....

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao fim de dois anos, é uma experiência gratificante ver terminada esta dissertação de mestrado. Aprendi muito, mas tenho consciência que “nada sei” e muito tenho por aprender. “O sonho comanda a vida”. Fui atrás de um sonho, que se tornou realidade, graças a minha persistência, paciência e ajuda de muitas pessoas, as quais estarei sempre grata.

À minha orientadora, Dra. Rejane da Silva Sena Barcelos, vão as minhas primeiras palavras de apreço, pela confiança, pelo acompanhamento constante durante todo trabalho, apoiando e desafiando-me ao longo de todo o processo de elaboração da dissertação. Os seus ensinamentos e estímulos, mas também as críticas e sugestões sempre pertinentes e direcionadas para os objetivos centrais deste estudo, a disponibilidade e presteza permanente, o rigor, a confiança, o elevado grau de exigência, a imensa capacidade de enriquecimento científico, o exemplo de competência, foram algumas das principais marcas da sua orientação, as quais me nortearam e ensinaram.....fazendo com que eu me tornasse, sem dúvida, “uma acadêmica melhor”.....muito melhor. **MUITO OBRIGADA PROFESSORA.**

Agradeço aos provedores de minha existência, e do que sou hoje, “meus pais”. De vocês recebi o presente mais valioso do universo: A VIDA !!! A vocês, toda gratidão do meu coração por terem aberto as portas do meu futuro iluminando o meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: O ESTUDO. A minha gratidão e reconhecimento por me ajudarem a dar “mais um passo”... entre tantos que já me ensinaram..com paciência e amor. **OBRIGADA POR ACREDITAREM EM MIM.**

Aos meus irmãos, pelo apoio, incentivo e carinho incondicional de sempre. **AMO VOCÊS.**

O meu amor e minha gratidão ao meu esposo, por ter assumido nosso lar nos meus incontáveis momentos de ausência, com tanto amor, com tanta hombridade, com tanta compreensão. Agradeço com toda gratidão do meu coração o incentivo, a

cumplicidade, as contribuições acadêmicas e, sobretudo, o amor com o qual me confortou em tantos momentos difíceis, que estes anos trouxeram.

Aos meus filhos, que apesar de ainda não compreenderem o significado de uma dissertação, são os responsáveis pelo término deste trabalho, me estimulando a ser a cada dia um ser humano melhor. Esta é para e por vocês.

À perita Dra. Neide Maria de Oliveira Godinho, do Laboratório de Biologia e DNA Forense do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues, por ter aceito a “co-orientação” deste trabalho. Agradeço sua disponibilidade, suas críticas, suas intervenções e a ajuda em tornar simples, aquilo que à partida parecia ser complicado. O seu também elevado grau de exigência, e a enorme capacidade científica são atributos que muito me ensinaram, nos vários momentos compartilhados, nos mais duros e também nos mais simples. Aprendi, com seu exemplo de competência e excelência profissional e pretendo aprimorar ao longo da minha ainda longa vida acadêmica. Pelas críticas, pelo estímulo permanente, pela disponibilidade, pela oportunidade que me foi dada de aprender, pelos valiosos ensinamentos e amizade que sempre me acolheu no laboratório, pela confiança, vai a minha amizade e gratidão sincera.

À professora Dra. Daniela Melo, do Programa de Mestrado em Genética da PUC – Goiás, pela gentileza e relevância das sugestões para melhoria do trabalho, bem como a presteza em colaborar. Muito obrigada pelo apoio e amizade.

Ainda, a todos do laboratório de Biologia e DNA Forense, obrigada pela simpatia, presteza e disponibilidade com que me acolheram no laboratório. Com vocês, também aprendi. De forma especial e grata, ao Breno e Alexandre.

Às peritas Laryssa, Mariana, Nígela e Tatiane reconheço e agradeço imensamente a colaboração e a disponibilidade nas diversas fases deste trabalho. Agradeço a presteza, as sugestões e a cordialidade.

À minha amiga de mestrado, Miriam... agradeço os vários momentos compartilhados, desde os mais simples, aos mais “desesperadores”!!!! Agradeço o incentivo, o companherismo e amizade.

Ao Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues da Superintendência de Polícia Técnico-Científica da Secretaria de Segurança Pública e Justiça do Estado

de Goiás pela oportunidade e suporte necessário para que a pesquisa se realizasse me permitindo conhecer e aprender em um laboratório de excelência. Grata.

A todos aqueles que me transmitiram conhecimentos e experiências, me guiaram além das teorias e das técnicas, expresse meu sincero agradecimento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura do complexo hexacoordenado (Fe^{2+} com seis ligações)	22
Figura 2:	Reação da síntese do luminol a partir do ácido 3-nitroftálico	27
Figura 3:	Tecidos de algodão cru (1,0cm X 1,0 cm) autoclavados, contendo, o primeiro, impregnado com sangue total, os seguintes, respectivamente, diluição de 1:1000; 1:10.000 e 1:1.000.000 e controle negativo.	41
Figura 4:	Controle negativo e controle positivo em A, e Positividade de luminescência no controle positivo em B	45
Figura 5:	Amostras diluídas na concentração de 1:1.000 em A. Luminescência observada nas amostras diluídas na concentração de 1:1.000 em B	45
Figura 6:	Amostras diluídas em 1:10.000 antes da aplicação do reagente em A. Ausência de luminescência na diluição de 1:10.0000 representada em B.	46
Figura 7:	Amostras diluídas em 1: 1.000.000 em A. Ausência de luminescência após aplicação do reagente quimioluminescente em B.	46
Figura 8:	Concentração de DNA (ng/ μl) das amostras contendo impregnação com sangue total em diferentes tempos de armazenamento. Azul, amostras expostas ao reagente; Em cinza, amostras sem exposição ao reagente.	47
Figura 9:	Quantificação das amostras de DNA nas primeiras 48 horas da aplicação do reagente, em relação ao grupo controle. Azul, amostras expostas ao reagente; Em cinza, amostras sem exposição ao reagente.	48
Figura 10:	Quantificação das amostras diluídas após 30 dias da aplicação do reagente, em relação ao grupo controle sob mesmas concentrações. Azul, amostras expostas ao reagente; em cinza, amostras sem exposição ao reagente.	49
Figura 11:	Perfil molecular obtido da amostra identificada como A2 - com 48 horas de armazenamento, sem o uso do reagente à base de luminol da amostra com sangue total. Observa-se a amplificação de todos os <i>loci</i> analisados com confirmação do gênero sexual do doador da amostra.	51

Figura 12: Perfil molecular obtido da amostra identificada como B3 - com 30 dias de armazenamento, com o uso do reagente à base de luminol. Observa-se amplificação inespecífica na maioria dos *loci* analisados com confirmação do gênero sexual do doador da amostra 55

Figura 13: Perfil molecular obtido da amostra identificada como A7 - com 30 dias de armazenamento, com o uso do reagente à base de luminol. Observa-se ausência de amplificação em todos os *loci* analisados 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 01:	Amostragem utilizada no experimento, suas diluições, controles e exposição ao reagente quimioluminescente.	40
Tabela 02:	Quantificação do DNA em amostras contendo impregnação de substância hematóide com 48 horas de armazenamento, com e sem exposição ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle e em diferentes concentrações.	47
Tabela 03:	Quantificação do DNA em amostras contendo impregnação de substância hematóide com 30 dias de exposição ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle em diferentes concentrações.	48
Tabela 04:	<i>Loci</i> amplificados e alelos observados nas amostras contendo impregnação com sangue total e em diferentes diluições com 48 horas de armazenamento sem exposição ao reagente quimioluminescente.	50
Tabela 05:	<i>Loci</i> amplificados e alelos observados nas amostras contendo impregnação com sangue total e em diferentes diluições com 48 horas de armazenamento com exposição ao reagente quimioluminescente.	52
Tabela 06:	<i>Loci</i> amplificados e alelos observados nas amostras contendo impregnação com sangue total e em diferentes diluições com 30 dias de armazenamento sem exposição ao reagente quimioluminescente.	53
Tabela 07:	<i>Loci</i> amplificados e alelos observados nas amostras contendo impregnação com sangue total e em diferentes diluições com 30 dias de armazenamento com exposição ao reagente quimioluminescente.	54
Tabela 08:	<i>Loci</i> amplificados nas amostras contendo impregnação de substância hematóide com 48 horas de armazenamento comparado ao grupo controle em diferentes concentrações.	57
Tabela 09:	<i>Loci</i> amplificados nas amostras contendo impregnação de substância hematóide com 30 dias de armazenamento e expostas ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle em diferentes concentrações.	57
Tabela 10:	loci e alelos do Kit AmpFISTR® NGM Select™	93

LISTA DE ABREVIATURAS

pb	pares de base
CT	do inglês <i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FRET	do inglês <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
HRM	do inglês <i>High Resolution Melting</i>
IPC	do inglês <i>Internal Positive Control</i>
mL	Mililitro
ICLR	Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues
µL	Microlitro
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
Pg/µL	Picogramas por microlitro
pH	Potencial hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
qPCR	PCR em Tempo Real
RPM	Rotações por minuto
SNP	do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphi</i>
SSLPs	do inglês do inglês <i>Single Sequence Length Polymorphisms</i>
STR	do inglês <i>Short Tandem Reapets</i>
SSLPs	do inglês <i>Single Sequence Length Polymorphisms</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O DNA forense.....	15
1.2 Coleta e preservação de evidências biológicas.....	17
1.2.1 A perícia científica.....	18
1.3 Locais de crime.....	19
1.3.1 Vestígio biológico: sangue.....	20
1.3.2 Testes presuntivos para detecção de sangue.....	23
1.3.3 O reagente quimioluminescente.....	25
1.4 Marcadores moleculares de DNA.....	29
1.4.1 Caracterização dos STRs forenses.....	33
1.5 Eletroforese capilar.....	35
1.6 Extração do DNA.....	36
1.6.1 Extração com fenol.....	37
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Caracterização das amostras.....	39
3.2 Aplicação do reagente quimioluminescente.....	40
3.3 Extração do DNA.....	41
3.4 Quantificação do DNA	42
3.5 Amplificação doDNA.....	42
3.6 Eletroforese e análise das amostras.....	43
4 RESULTADOS.....	44
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÃO.....	52
8 ANEXOS.....	53
9 REFERÊNCIAS.....	98

RESUMO

A Biologia Molecular mostrou-se uma ferramenta efetiva nos laboratórios forenses pela capacidade de identificar um indivíduo a partir de quantidades ínfimas de amostras biológicas como sangue, ossos, sêmen, cabelo, dentes, unhas, saliva, urina, entre outros fluidos biológicos recuperados no local do crime. Uma das principais evidências biológicas encontradas em local de crime são vestígios de substâncias hematóides. Esta pesquisa visou a análise de perfis moleculares de amostras biológicas expostas ao reagente quimioluminescente a base de luminol em diferentes tempos de armazenamento (48 horas e 30 dias). Com a quantificação de todas as amostras pode-se inferir que nas primeiras 48 horas de armazenamento, obtiveram-se concentrações variáveis de DNA e após a aplicação do reagente quimioluminescente. As amostras foram amplificadas por PCR utilizando um sistema multiplex AmpFISTR® NGM SElect™ e eletroforese capilar. Foram obtidos perfis moleculares completos e incompletos denotando inespecificidade conforme a qualidade e quantidade da amostra analisada. A seleção dos 17 marcadores moleculares mini-STRs em muito contribuiu para o sucesso desses perfis, permitindo estudo e análise de material degradado. Os dados indicam que a degradação da molécula de DNA exposta ao reagente quimioluminescente foi maior nas amostras diluídas em relação àquelas contendo impregnação com sangue total. A análise estatística das amostras com e sem exposição ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle e em diferentes concentrações, mostrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores quantificados obtidos. Ainda assim, analisar as amostras hematóides expostas ao luminol em menor tempo de armazenamento proporcionarão perfis moleculares compatíveis ao confronto de amostras.

Palavras – chave: Perfil molecular; STRs; luminol; substância hematóide

ABSTRACT

Molecular Biology shown to be an effective tool in forensic laboratories for the ability to identify an individual from minute amounts of biological samples such as blood, bones, semen, hair, teeth, nails, spittle, urine and other biological fluids recovered from the crime scene. One of the main biological evidence found at a crime scene are traces of bloodstains. This study aimed to analyze the molecular profiles of biological samples exposed to the chemiluminescent reagent luminol based on different storage times (48 hours and 30 days). With the measurement of all samples can be inferred that in the first 48 hours of storage, there was obtained DNA and varying concentrations after application of the chemiluminescent reagent. The samples were amplified by PCR using a multiplex system AmpFISTR® Select™ NGM and capillary electrophoresis. Molecular profiles were obtained complete and incomplete denoting specificity as the quality and quantity of the sample analyzed. The selection of molecular markers mini-STRs greatly contributed to the success of these profiles, allowing the study and analysis of degraded material. Our data suggest that the degradation of the DNA molecule exposed to the chemiluminescent reagent was higher in the samples compared to those containing diluted whole blood impregnation. Therefore, analyzing the bloodstains samples exposed to luminol in shorter storage provide molecular profiles compatible to clash samples.

Keywords: molecular profile; STRs; luminol; bloodstains

1. INTRODUÇÃO

1.1 O DNA FORENSE

O avanço da ciência e tecnologia no contexto forense teve seu ponto culminante em meados dos anos 80, quando as técnicas de identificação, fundamentadas na análise direta do ácido desoxirribonucleico (DNA), tornaram-se uma das mais poderosas ferramentas para a identificação humana e investigações criminais (Benecke, 1997). A determinação de identidade genética pela metodologia de DNA pode ser usada para demonstrar a culpabilidade dos criminosos, identificar corpos e restos humanos em desastres e campos de batalha, determinar paternidade com confiabilidade praticamente absoluta, elucidar trocas de bebês e detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica (Pena, 2005).

O primeiro método de utilização da análise do DNA para identificar indivíduos foi desenvolvido em meados da década de 1980 por Sir Alec Jeffreys. A metodologia demonstrou enorme potencial, mas houve sérias reservas quanto ao seu uso real, pois no início, havia dúvidas quanto à reprodutibilidade e a confiabilidade dos métodos (Duarte *et al.*, 2001; BROWN, 2001). Com o conhecimento atual, ao menos duas grandes vantagens devem ser citadas sobre a tipagem molecular: o DNA possui uma alta estabilidade química mesmo após um longo período de tempo e está presente em todas as células nucleadas do organismo humano, o que facilita sua obtenção (Malaghini *et al.*, 2006).

As primeiras técnicas forenses de identificação humana eram convenientes apenas para análise de DNA de evidências biológicas que contivessem células nucleadas. Atualmente, com a utilização do método de sequenciamento do DNA mitocondrial, essa limitação tem sido superada. Se antes, impressões digitais e outras pistas eram usadas para desvendar crimes; hoje, são inúmeros os espécimes biológicos dos quais o DNA pode ser extraído (Lee e Laad, 2001).

A Biologia Molecular mostrou-se uma ferramenta efetiva nos laboratórios forenses pela capacidade de identificar um indivíduo a partir de quantidades

ínfimas de amostras biológicas como sangue, ossos, sêmen, cabelo, dentes, unhas, saliva, urina, entre outros fluidos biológicos recuperados no local do crime. Essa técnica, conhecida como datiloscopia genética (*genetic fingerprinting*) ou perfil de DNA, em muito colabora na elucidação de crimes (Brown, 2001; Benecke, 2002).

O perfil de DNA contém muitos polimorfismos, que são posições onde a sequência de nucleotídeos difere em cada membro da população. Para ser considerado um polimorfismo, o alelo raro de um determinado loco deve estar presente em mais de 1% dos indivíduos da população (Brown, 2001).

O método de análise do DNA para finalidades forenses usa as mesmas técnicas e princípios que são rotineiramente empregadas em uma ampla variedade de situações médicas e genéticas, tais como o diagnóstico e o mapeamento genético (Duarte *et al.*, 2001). A molécula de DNA possui como característica a resistência a várias condições que destroem a maioria dos outros compostos biológicos como as proteínas, carboidratos e lipídeos. Além disso, poucas células nucleadas, com pequenas quantidades de DNA, são necessárias para a identificação de um indivíduo, contrapondo com os métodos mais antigos, como os que empregavam grupos sanguíneos e enzimas, que exigiam quantidades elevadas de material biológico (Duarte *et al.*, 2001; Schneider, 1997).

Com uma incrível sensibilidade e poder de discriminação, a análise de DNA tem sido a “figura-chave” e promete grandes progressos no campo da ciência forense (Lee e Laad, 2001) fornecendo aos investigadores uma grande chance de excluir suspeitos que não estão relacionados a cena do crime (Baechtel e Comey, 1996).

O número de tribunais que tem aceitado evidências baseadas na análise de DNA cresce a cada dia, levando-nos a crer que, em um futuro não muito distante, esta tecnologia será empregada em todo o sistema legal (Primorac *et al.*, 2000). Porém, para que não ocorra nenhum tipo de erro e para a precisão dos resultados, regras rígidas de coleta e processamento das amostras devem ser adotadas (Lee e Laad, 2001).

Nas últimas décadas, muitas técnicas foram desenvolvidas objetivando a identificação genética precisa de indivíduos priorizando o fator tempo e quantidade de amostra, dentre elas, as mais significativas são *Restriction Fragment Length Polymorphism* - VNTR, *Polymerase Chain Reaction* - PCR e *Short Tandem Repeats* - STR (Albuquerque, 2004).

1.2 COLETA E PRESERVAÇÃO DE EVIDÊNCIAS BIOLÓGICAS

Os resultados da análise de DNA em tribunais estão intimamente relacionados com a cadeia de custódia das amostras biológicas coletadas em locais de crime e métodos de preservação. Do ponto de vista técnico e criminalístico, a molécula de DNA pode ser obtida de vários suportes e de ambientes diferentes, associado a sua estabilidade, se armazenado em boas condições, tem-se grandes chances de resultados confiáveis (Benecke, 2005).

O método específico de coleta dependerá da quantidade, do estado de conservação da evidência biológica. Em geral, uma quantidade significativa de material deve ser coletada para garantir a extração de DNA suficiente para os testes. No entanto, é importante preservar a amostra, livre de sujeira adicional, gorduras, fluidos e outros materiais que possam afetar o processo de análise de DNA. Portanto, protocolos contendo procedimentos operacionais padrão (POP) de coleta de amostras tem sido previamente descritos na literatura (Lee e Laad, 2001).

Deve-se, também, levar em conta que o material biológico recuperado na cena do crime pode sofrer alterações ambientais (luz, altas temperaturas, reativos químicos, etc) que poderão ocasionar quebras e alterações dos nucleotídeos e, como consequência, modificar a composição e a estrutura da molécula de DNA, dificultando a análise (Bonaccorso, 2004).

Uma vez que as amostras foram coletadas, elas devem ser imediatamente encaminhadas ao laboratório forense para o armazenamento em ambiente frio e seco evitando a deterioração da amostra até que sejam submetidos a análise (Benecke, 2005).

Existem fontes potenciais que podem levar a erros durante todo o estágio do processamento da prova física, desde a coleta em campo, a análise no laboratório, até a interpretação dos resultados. Nem todos os erros tem conseqüências prejudiciais; muitos nem tem conseqüências e muitos são prontamente identificados e podem ser corrigidos. Os lapsos que mais preocupam, são aqueles que possam levar a uma falsa semelhança. Para conseguir resultados precisos, cuidados e atenção a detalhes, devem ser utilizados em todos os estágios do processo de identificação pelo método de DNA, inclusive a atividade humana (Duarte *et al.*, 2001).

1.2.1 A PERÍCIA CIENTÍFICA

É crescente o papel que a ciência desempenha nas investigações criminais (Rodrigues, Silva e Truzzi, 2010). Com a legislação a cada dia mais voltada à proteção dos direitos humanos, deve-se salvaguardar a integridade física humana não se concebendo ao profissional de polícia moderno a obtenção de uma confissão de um agravo por parte de um eventual suspeito por meios insidiosos ou cruéis. Dessa forma, torna-se necessário que as técnicas utilizadas para a comprovação do fato em questão que sejam analisadas utilizando o caminho da ciência e da tecnologia, utilizando métodos rigorosos e que forneçam resultados tão precisos quanto possíveis, sob pena de não terem valia perante o tribunal caso os vestígios coletados no local de crime durante a investigação não sejam tratados adequadamente. Nesse sentido, importantes descobertas do mundo científico são aplicadas em criminalística para elucidar toda espécie de delito (Duarte, 2010).

Um local de crime deve ser analisado para materializar o fato através de prova pericial. Crimes mais violentos, como os crimes contra a pessoa homicídio, por exemplo, costumam apresentar sinais evidentes e, em muitos casos, o perito realiza a identificação e coleta de indícios no local, como pegadas ou vestígios de sangue. Contudo, com o decorrer do tempo, tais vestígios, principalmente os biológicos, podem perder propriedades

importantes para confiabilidade dos testes que serão realizados para fins forenses (Rodrigues; Silva; Truzzi, 2010).

Os fatores que podem prejudicar a análise forense podem ser ambientais aos quais eventualmente os vestígios estejam expostos até o momento em que são encontrados, ou pela manipulação humana, com a intenção de ocultá-los para que o fato ocorrido seja encoberto. Há locais em que a cena de crime foi alterada na tentativa de ocultar também o corpo (Budowle, 1996).

Porém é imprescindível uma análise detalhada do local para revelar cenas ocultas. Um dos recursos disponíveis é a utilização de reagentes químicos que revelam evidências biológicas que orientam a busca da verdade. Dentre os vários tipos de vestígios encontrados em locais onde ocorreu um crime, os hematóides são os mais comuns (Pitarch *et al.*, 2010).

1.3 LOCAIS DE CRIME

Todo acontecimento, de natureza criminal deixa elementos materiais (indícios) no local. O objetivo da investigação subsequente é interpretar corretamente os fatos, reconstruí-los e entender o evento. O indício coletado na cena do crime, após análise e confirmação do vínculo com o delito, torna-se evidência material, com valor probatório, na persecução penal se for corretamente preservada e analisada. Evidência material pode ser qualquer elemento encontrado no local de crime, desde grandes objetos ou itens microscópicos. (Almeida, 2009).

Uma das principais evidências biológicas encontradas em local de crime são sem dúvida, vestígios de substâncias hematóides. Podem ser encontrados em locais de crime em diferentes suportes tais como indumentárias, arma branca ou de fogo, pedaços de tecido, veículos, em objetos apreendidos, etc. No direito penal, é comum vestígios de mancha de sangue proporcionar a sentença do criminoso. Se o procedimento de coleta, transporte e análise for corretamente feito, o sangue encontrado estabelece uma forte relação entre o

assassino, a vítima e a cena do crime (Mozayani & Noziglia, 2006; Malatesta, 2009; Adler *et al.*, 2009).

Os criminosos costumam modificar o local de crime, lavando para retirar as manchas de sangue aparentes, tornando-as invisíveis a olho nu, mas as manchas latentes podem ser detectadas por meio de reveladores químicos (Dias Filho, 2010).

Em uma cena de crime, o sangue encontrado servirá para uma variedade de análises laboratoriais, tais como identificar a origem da amostra, caracterizar o uso de substâncias entorpecentes, através da análise dos respingos de sangue encontrados, demonstrar o possível tipo de arma utilizada no delito. O perito criminal, inicialmente, pesquisa a amostra no sentido de ter a certeza de que o vestígio encontrado é realmente sangue e, posteriormente, se é humano (Antedomenico, 2010;Declave *et al.* , 2010).

As técnicas de detecção de vestígios de manchas de substâncias hematóides devem ser corretamente escolhidas, pois alguns agentes químicos interferem na análise da molécula de DNA, o que torna inviável para testes posteriores. Além do mais, o Código de Processo Penal Brasileiro cita no “art.170. Nas perícias de laboratório, os peritos guardarão material suficiente para a eventualidade de nova perícia. Sempre que conveniente, os laudos serão ilustrados com provas fotográficas, ou microfotográficas, desenhos ou esquemas” (Monteiro, 2010).

Portanto, o reagente químico a ser escolhido não deve interferir em testes posteriores não podendo reagir com o sangue encontrado de modo a impossibilitar a guarda de uma quantidade de material para uma posterior contra-prova (Dolinski, 2009; Silva *et al.*, 2012).

1.3.1 VESTÍGIO BIOLÓGICO: O SANGUE

O sangue é um tecido que desempenha diversas funções imprescindíveis no organismo humano. Constituído pelo plasma, a fase líquida do sangue, composta principalmente por água, proteínas, gorduras e sais orgânicos e

minerais, que corresponde a mais de 50% de seu volume total; as plaquetas, que são produzidas na medula óssea, são anucleadas e têm função de colaborar na coagulação sanguínea de forma mecânica em caso de lesões vasculares (Leite, Silva Júnior e Miranda, 2007); os leucócitos, também são produzidos na medula óssea e sua principal atuação se dá no sistema imunológico (Santos *et al.*, 2007); e os eritrócitos, mais conhecidos por hemácias, que contêm a hemoglobina e cuja função é efetuar o transporte do oxigênio dos pulmões aos tecidos e do gás carbônico no sentido inverso (Almeida, 2009).

A coloração do sangue depende da concentração de oxigênio dissolvido nele: escarlate, quando contém uma boa quantidade do gás; até vermelho escuro, quando a quantidade de oxigênio é baixa e a concentração de dióxido de carbono é mais elevada (Monteiro, 2010).

A hemoglobina, componente primordial das hemácias, é um complexo hexacoordenado responsável pela condução de oxigênio aos tecidos do organismo, e é composta por uma porção protéica, chamada globina, e quatro cadeias polipeptídicas ligadas cada uma a um grupamento prostético heme (Almeida, 2009). A estrutura da globina é composta por dois pares de cadeias polipeptídicas – cadeia alfa e cadeia beta. A cadeia alfa é formada por 141 resíduos de aminoácidos, e a cadeia beta pela junção de 146 resíduos de aminoácidos. Os grupamentos heme consistem em complexos de coordenação protoporfirínicos- Fe^{2+} , em que o ferro encontra-se ligado ao centro do anel porfirínico por quatro átomos de nitrogênio, restando dessa forma duas posições axiais de coordenação – uma delas é preenchida pela ligação com a globina, enquanto a outra permanece livre para um ligante exógeno, que em geral será o oxigênio, conforme ilustrado na Figura 01 (Barni *et al.*, 2007).

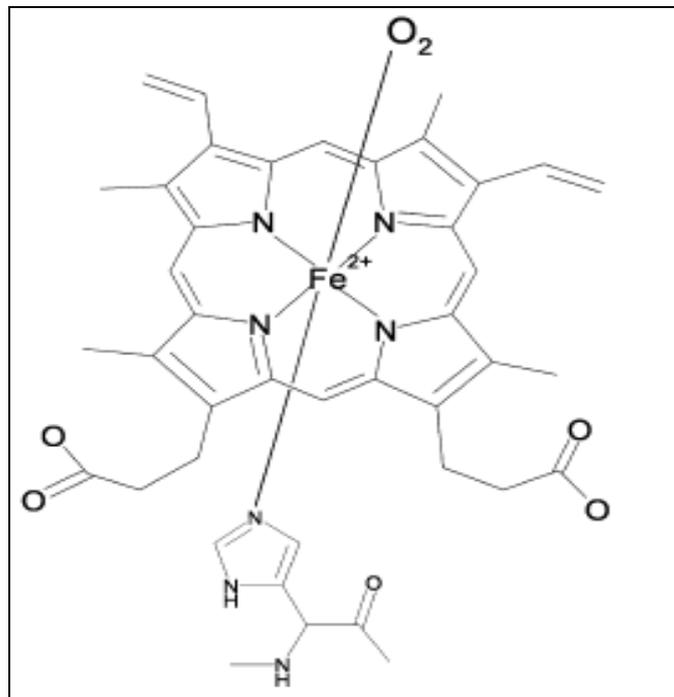


Figura 1. Estrutura do complexo hexacoordenado (Fe^{2+} com seis ligações) hemoglobina/oxigênio. Fonte: BARNI *et al.* (2007).

Testes de presunção são utilizados para a detecção inicial da caracterização da presença do que pode potencialmente ser sangue. Segundo Shanan, Watson e Daéid (2007), para que tais testes sejam considerados bons, devem englobar propriedades como rapidez, segurança, sensibilidade e especificidade, além de não reagir com a amostra e contaminá-la, interferindo em análises posteriores, como a da molécula de DNA. Existem testes de natureza quimioluminescente, que são empregados em locais nos quais há a suspeita de manchas de sangue, para torná-las visíveis em regiões que passaram por processos de limpeza e revelar vestígios que devido ao tempo transcorrido já se encontram irreconhecíveis pela observação a olho nú (Monteiro, 2010; Silva *et al.*, 2012).

Dentre os testes de presunção utilizados para o sangue estão a fenoltaleína, o reagente de benzidina, o negro de amido e o luminol (Oliveira, 2006; Monteiro, 2010).

1.3.2 TESTES PRESUNTIVOS PARA DETECÇÃO DE SANGUE

Com o aperfeiçoamento das técnicas forenses, gradativamente mais centradas na análise molecular, deve-se ter a preocupação de que os reveladores usados para detecção de sangue não alterem a estrutura das moléculas biológicas, especialmente molécula de DNA (Garofano, 2006).

Essas possíveis alterações comprometem a análise da evidência, ocasionando impacto negativo na investigação forense, especialmente em longo prazo, pois muitas vezes estas amostras não são analisadas imediatamente, e sim, armazenadas para posterior análise molecular a qual pode ocorrer semanas ou meses após sua coleta na cena de crime (Budowle, 1996).

Dessa forma, uma análise detalhada da ação dos agentes reveladores sobre a integridade molecular do DNA em manchas de substância hematóide torna-se fundamental para boa prática forense. A integridade e a preservação das amostras constituem-se em fatores essenciais a obtenção de perfis genéticos bem caracterizados e definidos, os quais são pré-requisito para confecção de laudos periciais com excelente nível técnico-científico. Dessa forma, qualquer degradação que ocorra pode inviabilizar o confronto genético com amostras de referência (Corrêa, 2010).

Manchas de sangue em um local de crime revelam e caracterizam a dinâmica dos fatos, ou seja, o modo que o agressor agiu e deixou o local e que tipo de instrumento utilizou para cometer o delito. Os vestígios deixados na cena do crime ficam expostos a diversos fatores que podem comprometer sua conservação, desde aqueles do próprio ambiente, como chuva, calor e umidade, até a manipulação humana com a intenção de encobri-los para dificultar sua localização pela polícia e a conseqüente descoberta do fato (Chemello, 2007).

O sangue é um vestígio frequentemente encontrado em cenas de crime contra a pessoa e outros crimes com envolvimento de violência física. Muitas vezes não se consegue vincular o suspeito a mancha de sangue encontrada,

mas o resultado negativo de tal confronto é útil para descartar o envolvimento de um cidadão. O sangue, ao sair do organismo, degrada-se. A hemoglobina oxida-se, o átomo de ferro muda de heme para hemina, ou hematina, o qual ocasiona a alteração da cor da mancha de sangue de vermelha para marrom. No estado férrico, o grupo heme possui atividades catalíticas e capacidade de participar em reações redox como um grupo de enzimas chamadas peroxidases. Essa atividade é empregada como base dos testes presuntivos para identificação de sangue (Albertin, 1998).

O teste presuntivo tem como princípio a reação de oxidação de uma substância (indicador) por um agente oxidante, catalisada na presença de sangue. O grupo heme da hemoglobina atua sobre o peróxido de hidrogênio adicionado, liberando o oxigênio necessário para oxidar o indicador utilizado. O resultado é um composto corado ou emissão de luminescência (Sawaya e Rolim, 2004). Esses testes devem apresentar sensibilidade suficiente para detectar manchas de sangue invisíveis a olho nu e não podem influenciar o resultado de exames posteriores. O suporte, ou seja, o material onde são encontradas as manchas de sangue influencia na sensibilidade dos exames presuntivos. Como por exemplo, fibras de algodão geram boas análises, pois possuem maior poder de retenção que os tecidos compostos por fibras sintéticas (Malatesta, 2009).

Existem testes de natureza quimioluminescente que são mais empregados em locais nos quais há a suspeita de que houve sangue, para tornar visíveis manchas em regiões que passaram por processos de limpeza e revelar vestígios que devido ao tempo transcorrido já não são reconhecíveis pela observação (Monteiro, 2010).

Os testes que utilizam indicadores quimioluminescentes como o luminol, apresentam a grande vantagem de detectarem, em curto período de tempo, traços de sangue em grandes superfícies e em suportes escuros, mesmo após terem sido lavados (Dias, 2011; Declave *et al.*, 2011).

Já a benzidina acética (Teste de Adler Ascarelli), teste presuntivo de cor que possui maior sensibilidade, com poder carcinogênico tornando um ponto desfavorável no uso cotidiano. Na prática, a benzidina apresenta efeito

deletério sobre os testes subseqüentes degradando o DNA. No caso de pouca quantidade amostra de sangue, espalhada em pequena extensão do local de crime, o uso de benzidina pode contaminar todo o vestígio (Pascual e Grifo, 2000).

De acordo com Declave (2011), a fenoltaleína (Reagente de KASTE MEYER), é um indicador de pH reagindo quando em contato com substâncias de caráter básico, produzindo um produto de cor rosa. Já em pH ácido ou neutro, não há alteração da cor. Portanto, a fenoltaleína não reage somente com sangue, mas qualquer substância que possua caráter básico, o que aumenta a possibilidade de resultados falso-positivos (Atkins & JonesS, 2012).

O teste de luminol possui alta sensibilidade e menor especificidade possibilitando gerar resultados falso positivos utilizando peroxidases de plantas, metais (cobre, ferro e outros), produtos a base de cloro (hipoclorito) e outros oxidantes (Tobe, 2007).

No intuito de aperfeiçoar o uso do luminol, há no mercado uma variante da fórmula original, denominada *Bluestar Forensic*. De acordo com as recomendações do fabricante a luminescência emitida por esse reagente é mais forte e duradoura que a emitida pelo luminol; não requer escuridão total para a caracterização da reação; as reações positiva e falso-positivas podem ser diferenciadas, e, não tendo, assim, como o luminol, efeito deletério sobre o exame da molécula de DNA, extraída de manchas de sangue encontradas na cena de crime. O reagente pode ser aplicado várias vezes e ainda receber resultados de genotipagem, sendo atualmente, o teste presuntivo de sangue mais sensível do mercado (Marquete, 2006).

1.3.3 O REAGENTE QUIMIOLUMINESCENTE

A luminescência, um termo geral utilizado para designar diversos processos de emissão de luz, é um fenômeno bastante instigante e estudado desde os tempos mais remotos. Ocorre quando elétrons excitados após a absorção de uma determinada quantidade de energia emitem radiação luminosa ao

retornarem ao seu estado fundamental, sem que uma parte significativa dessa energia se perca, se dissipando na forma de calor (Dias, 2001; Menezes, 2010; Silva, 2012). Essa energia eletromagnética é emitida por moléculas que possuem comprimento de onda na região localizada entre o infravermelho (800 nm) e o ultravioleta (400 nm) no conhecido espectro eletromagnético (Costa, 1992 ; Rossi, 2002).

A quimioluminescência, de acordo com Leite *et al.* (2004) é um subtipo de luminescência em que a energia de excitação do elétron para a produção da radiação luminosa advém de uma reação química, ou seja, a produção de luz ocorre devido a quebra de ligações ricas em energia já existentes na molécula que reage ou formadas a partir de rearranjos moleculares (intermediários da reação). O tempo da reação quimioluminescente e a duração da emissão da radiação são variáveis de acordo com a natureza do material que a emite e, de acordo com Rossi (2002) variam de períodos muito pequenos (menores que 1 s) até muito longos (cerca de um dia).

A quimioluminescência tem sido amplamente utilizada em diversos tipos de ensaios laboratoriais, destacando-se nas últimas décadas na criminalística com a utilização de compostos que produzem reações quimioluminescentes instantâneas ao entrarem em contato com tecidos biológicos que podem ser facilmente encontrados em locais nos quais um crime contra a pessoa tenha sido praticado como sêmen e, principalmente, sangue (Webb; Creamer; Quickenden, 2006).

O luminol é um composto que possui poderosas propriedades quimioluminescentes mediante oxidação que são caracterizadas pela emissão de luz azulada (Menezes, 2010). De acordo com Navarrete *et al.* (2005), a quimioluminescência do luminol em meio aquoso básico, ocorre em presença de um reagente oxidante (H_2O_2 , O_2 , $HOCl$) e, normalmente, de um metal de transição ou certos íons inorgânicos. Ele é amplamente utilizado em todo o mundo para testar a presença de sangue, uma vez que, o grupo heme, mesmo em quantidades mínimas, também é capaz de catalisar sua oxidação em solução alcalina (Gross; Harris; Kaldun, 1999; Leite; Fatibello-Filho; Rocha,

2004; Barni *et al.*, 2007). Não obstante, em um local de crime os vestígios nem sempre estão evidentes (Lytle, 2003).

Fatores ambientais e, principalmente, manipulações intencionais influenciam em seu estado de conservação (Pitarch *et al.*, 2010), o que pode dificultar e muito a sua localização e identificação ou mesmo uma coleta para posteriores análises laboratoriais que serão valiosas no eventual processo criminal que seguirá a fase de investigação.

O luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona) é um reagente mundialmente conhecido por suas propriedades quimioluminescentes e é popular pela eficácia na detecção de sangue (Monteiro, 2010), muito bem caracterizada pela imediata emissão de luz azul ao entrar em contato com o referido tecido. Ele foi sintetizado pela primeira vez pelo químico alemão H. O. Albrecht, em 1928 e foi o primeiro composto a ser utilizado para a identificação de manchas de sangue, em meados dos anos 30 do século passado (Menezes, 2010; Monteiro, 2010). Atualmente, um dos principais métodos para a sua obtenção é por meio da reação da hidrazina com o ácido 3-nitroftálico, mediante aquecimento (Chemello, 2007), com a posterior redução do grupamento nitro do 5-nitroftalhidrazina para a formação do produto final, conforme demonstrado na Figura 02.

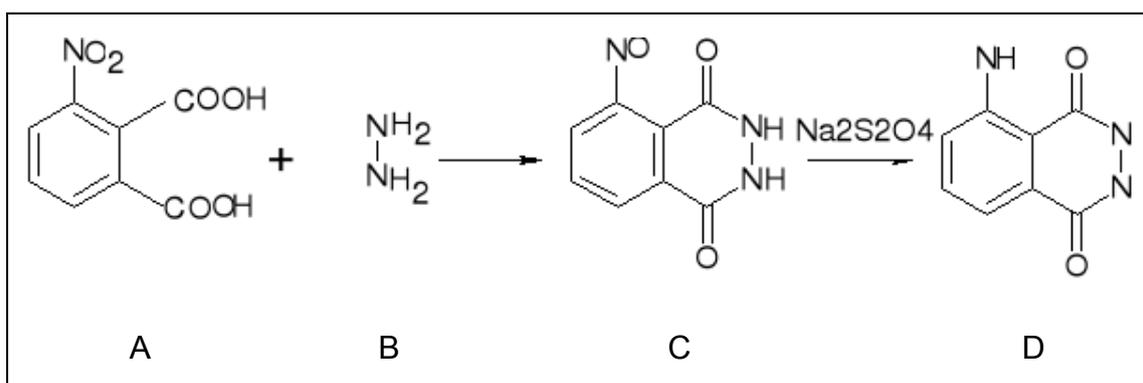


Figura 2 – Reação de síntese do luminol a partir do ácido 3-nitroftálico. Em, A) Ácido 3-Nitroftálico; B) Hidrazina; C) 5-Nitroftalhidrazina; D) Luminol. Fonte: MONTEIRO (2010).

A reação, para ocorrer, necessita de um agente oxidante – o mais comumente utilizado é o peróxido de hidrogênio – e um catalisador – utiliza-se

normalmente um metal de transição. Pode ser realizada em alguns tipos de solventes orgânicos, como o dimetilssulfóxido, ou em soluções aquosas com boa resposta, mas sua eficiência ótima ocorre em meio básico (Dias, 2001; Almeida, 2009).

No mecanismo mais provável inventado para descrever a reação mais simples do luminol em meio aquoso, um metal de transição que age como catalisador realiza a conversão do luminol em diazoquinona. Essa molécula é então atacada pelo ânion proveniente do peróxido de hidrogênio hidrolisado, formando um endoperóxido (3); este perde uma molécula de nitrogênio (N₂) e forma então o diânion do ácido 3-aminoftálico (4), que já é produzido no estado excitado. Essa é a espécie que sofrerá decaimento, gerando a quimioluminescência por meio da emissão de luz em um comprimento de onda de 431 nm quando o elétron excitado pela reação retorna ao seu estado fundamental (Dias, 2001; Marquette & Blum, 2006).

O luminol é eficaz para detectar sangue, mesmo depois de lavado diversas vezes (Ponce *et al.*, 2002) devido ao fato de que, presente nas hemácias, está a hemoglobina que contém íons de ferro em seu grupo heme e age como o catalisador necessário para desencadear a reação quimioluminescente do luminol (Ferreira & Rossi, 2002). Quando ainda se encontra dentro do organismo, a hemoglobina permanece protegida pelos eritrócitos que possuem mecanismos (enzimáticos e não enzimáticos) para evitar sua desnaturação, mantendo os íons ferro na forma Fe²⁺. Ao deixar o corpo, o sangue passa a estar exposto a uma série de processos de degradação, passando por hemólises e reações de oxirredução catalisadas em um primeiro momento por enzimas de sua própria estrutura celular e, também, por aquelas presentes em microrganismos que se encontram no ambiente (Barni *et al.*, 2007). Sob tais condições, ocorre então a degradação da porção polipeptídica da hemoglobina, e a oxidação do íon ferroso (Fe²⁺) passa a acontecer de forma espontânea, com a conversão da hemoglobina a metahemoglobina e, em meio alcalino, este íon passa a coordenar-se com grupos hidroxila em substituição ao O₂, que anteriormente ligava-se ao Fe²⁺ (Almeida, 2009).

Esse novo grupo prostético heme composto por íons férricos em que as moléculas de oxigênio estão sendo substituídas por hidroxilas é chamado hematina (ferroprotoporfirina) e o ciclo catalítico da reação luminol/sangue no mecanismo proposto por Maloney e Thornton em 1985 (Almeida, 2009) é iniciado e finalizado por ele: ao borrifar o reagente sobre uma mancha de sangue, os grupamentos heme férricos (Fe^{3+}) perdem mais um elétron e vão para um novo estado de oxidação, formando dessa forma intermediários instáveis contendo Fe^{4+} , que então catalisam sua oxidação, produzindo assim a luminescência, enquanto são reduzidos novamente a Fe^{3+} (Barni *et al.*, 2007). Existem algumas outras proposições para descrever o mecanismo, no entanto esta ainda permanece como a mais aceita atualmente (Chemello, 2007).

Uma das maiores preocupações com relação à utilização dos testes de presunção é que os componentes aplicados sobre o material estudado danifiquem sua estrutura de alguma forma e prejudiquem análises laboratoriais, como a extração de DNA, que é de extrema importância para a atividade pericial (Quickenden & Cooper, 2001).

1.4 MARCADORES MOLECULARES DE DNA

O objetivo da análise forense de DNA é diferenciar um indivíduo de outro, através de um grande número de características, dando-lhe uma identidade absoluta como pessoa, podendo assim ser diferenciada entre milhões de outras (Alonso, 2013).

No estabelecimento do perfil genético do indivíduo são analisadas algumas regiões do DNA que apresentam maior variação individual e facilidade de estudo (são reconhecidas como marcadores genéticos ou moleculares). Os marcadores moleculares podem ser utilizados para caracterizar o DNA de um indivíduo em um padrão ou perfil de fragmentos que lhe seja particular (DUARTE *et al.*, 2001).

Os marcadores moleculares nos dias de hoje estão cada vez mais sendo utilizados pelos pesquisadores para desvendar seqüências de DNA para vários fins. Existem dois tipos de marcadores moleculares: os que hibridizam e os que amplificam. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment of Length Polymorphism*) e Minisatélites ou *locos VNTR* (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles que amplificam o DNA, incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) Microsatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Coutinho, 2006).

Os que hibridizam possuem uma grande desvantagem, sendo de grande custo e tempo para realizá-los. Como vantagem estes marcadores possuem uma consistência nos resultados. O VNTR possui um alto grau de polimorfismo. Os que amplificam possuem uma baixa consistência nos resultados, mas em compensação o tempo de obtenção dos resultados e a facilidade no uso destas técnicas, além dos custos, vêm colocando estes marcadores nos mais utilizados pelos pesquisadores).(Andersen, 2003)

Um dos marcadores mais utilizados hoje em dia é o STR (*Short Tandem Repeat*). Os STR's (minissatélites) são regiões repetitivas do DNA que são obtidas por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sendo possível por meio dessa técnica realizar a tipagem do DNA com quantidades mínimas de amostras, tais como, fio de cabelo, manchas de sangue em uma arma, entre outras (DOLINSKY; PEREIRA, 2007).

Os polimorfismos presentes no DNA mitocondrial e no cromossomo Y também são analisados e usados em algumas situações (LIMA, 2010). Entretanto, os novos marcadores de polimorfismos que são baseados na substituição de nucleotídeos únicos (SNP's) e os polimorfismos de inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos (polimorfismos de inserção-deleção ou, indels), ambos apresentam grande vantagem, pois podem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos (50 pb ou menos). Esse procedimento

é adequado para se estudar moléculas de DNA extremamente degradadas como no caso de cadáveres em estado muito avançado de decomposição ou carbonizados (Pena, 2005).

A diversidade nestas regiões consiste no número de repetições de uma dada sequência de bases, que nos STR's pode ser de 1 a 4 bases e nos VNTR's de 10 a 100 pares de bases. Sendo assim, devido a quantidade de repetições presentes, cada indivíduo terá um tamanho diferente para a região do DNA que contém um dado STR ou VNTR. Com isso, o alelo vai representar cada possibilidade de tamanho (ou de número de repetições) que pode ser encontrada (Lima, 2010).

Os marcadores moleculares mais comumente aplicados nas investigações forenses são os VNT's, STR's e SNP's, sendo que os STR's superam várias limitações relacionadas à manipulação de sequências VNTR's, fazendo com que a tipagem de marcadores STR's, seja mais utilizada para identificação por DNA de vestígios biológicos em geral (Dolinsky;Pereira, 2007).

No estabelecimento do perfil genético do indivíduo são analisadas algumas regiões de DNA que apresentam maior variação individual e facilidade de estudo (marcadores genéticos). Estes podem ser utilizados para caracterizar o DNA de um indivíduo em um padrão ou perfil de fragmentos que lhe seja particular (Duarte *et al.*,2001).

Um dos marcadores mais utilizados hoje em dia é o STR (*Short Tandem Repeat*). Os STR's (minissatélites) são regiões repetitivas do DNA que são obtidas por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), sendo possível por meio dessa técnica realizar a tipagem do DNA com quantidades mínimas de amostras, tais como, fio de cabelo, manchas de sangue em uma arma, entre outros (Dolinsky & Pereira, 2007).

Os STR's (*Short tandem repeats* ou repetições curtas *in tandem*) são nucleotídeos alinhados, em curtas repetições, organizados sequencialmente e denominados de microssatélites (Ferreira & Grattapaglia, 2010).

Os marcadores microssatélites são trechos de DNA constituídos em unidades repetidas de dois, três ou quatro nucleotídeos e localizados dentro de regiões de sequência única com número menor do que 100 pares de nucleotídeos (Lewin,2001). Assim, cada região genômica que contenha um determinado número de repetições de uma destas sequências, constitui-se num loco genético, altamente variável entre indivíduos e multialélico (Ferreira;Grattapaglia, 1995).

Os microssatélites também podem ser designados de SSLPs (*Single Sequence Length Polymorphisms*) ou STRs (*Short Tandem Repeats*) (Edwards *et al.* ,1991). Existem autores que fazem distinção entre microssatélites e STRs, considerando que os primeiros são constituídos por repetições de 2 pb enquanto que os segundos são constituídos por repetições de 3 a 6 pb; contudo, e de acordo com a linguagem científica institucionalizada, estes dois termos serão usados com o mesmo significado (Koreth *et al.*, 1996).

Os STRs existem abundantemente tanto em procariontes como eucariontes, representando cerca de 30% do DNA repetitivo e 3% da totalidade do genoma humano. Em média, pode encontrar-se um STR a cada intervalo de 2000 pares de bases (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001). Embora geralmente se considere que os STRs estão localizados nas regiões não codificantes do DNA, existe também uma pequena percentagem (cerca de 8%) que se localiza em regiões codificantes (Lagoa, 2008).

A distribuição destes microssatélites pelos cromossomos é heterogênea e irregular, podendo encontrar-se espalhados em diferentes graus de densidade, inclusive nas regiões subteloméricas, locais onde se localizam em menor quantidade (Koreth *et al.*,1996). Além disso, a sua frequência varia entre cromossomos; no homem, o cromossoma 19 é o que apresenta maior quantidade de STRs (Subramaninan *et al.*,2003).

Os STRs podem ser classificados de acordo com o comprimento da unidade de repetição; as repetições podem distinguir-se em mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídicas, conforme sejam constituídas por uma, duas, três, quatro, cinco ou seis pares de bases, respectivamente (quanto maior for a unidade de repetição, mais informativo se considera o microssatélite)

(*International Human Genome Sequencing Consortium*,2001). Por outro lado, tendo em conta a estrutura da repetição, existem repetições perfeitas ou simples, quando contém apenas uma unidade de repetição e imperfeitas ou compostas, quando são constituídas por mais do que uma unidade de repetição, distintas entre si (Urquhart *et al.*,1994). Quando os alelos de um STR são constituídos por unidades de repetição incompletas são designados de microvariantes, sendo representados pelo número de unidade de repetição completas, seguido do número de nucleotídeos que formam a repetição incompleta. O exemplo mais comum de um microvariante é o alelo 9.3 do *locus* THO1, que é composto por nove unidades de repetição completas e uma unidade incompleta, constituída por três nucleotídeos (Butler, 2005).

Os STRs mais frequentes no genoma humano são constituídos por repetições dinucleotídicas, que confirma a constatação de que a frequência de cada um dos tipos anteriormente referidos diminui 'a medida que aumenta o seu tamanho. Além disso, também se verifica que as unidades de repetição mais frequentes apresentam uma predominância de adeninas: A, AC, AAAN, e AG, por ordem decrescente de abundância (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001 e Nadir *et al.*, 2006).

Esses marcadores são importantes ferramentas em estudos de vínculo genético, identificação criminal de suspeitos, estudos de filogenia, entre outros (Martinhago, 2010).

Os marcadores moleculares do tipo SNP's (*Single Nucleotide Polymorphism* ou Polimorfismo de Base Única) abrangem uma classe mais geral de polimorfismos sendo mais frequentes que os marcadores microssatélites e são distribuídos uniformemente por todo o genoma (Lewin, 2001). São os polimorfismos mais comuns dentro do genoma humano, possuindo apenas variação em uma base no interior de uma sequência de DNA que pode ser codificante ou não, e ocorrem aproximadamente uma vez a cada 1.350 pb no genoma humano (Araújo *et al.*, 2008). Com isso, são importantes para análise genética, tendo uma maior estabilidade quando comparado com os microssatélites (Alonso, 2013).

Os marcadores SNP têm como base as alterações mais elementares da molécula de DNA que são as mudanças em bases únicas da cadeia polinucleotídica (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). Os marcadores SNP, geralmente, são bi-alélicos, ou seja, são encontrados apenas duas variantes em uma espécie (Ex: um alelo corresponde a um par de bases). Os SNP's podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (Campan,2009).

1.4.1 Caracterização dos marcadores moleculares do tipo STR forense

Os marcadores genéticos usados no contexto forense são microssatélites constituídos por unidades de repetição que variam entre 3 a 5 pares de bases, que geralmente se repetem entre 5 a 30 vezes, denominados *Short Tandem Repeats* (Campam, 20009).

Os *loci* STR são altamente polimórficos, com uma extensão inferior a 350 pb podendo ser analisados através de reações de polimerização em cadeia (PCR *multiplex*). Esta característica permite a sua utilização em amostras degradadas ou com quantidades mínimas de material genético, o que acontece com muita freqüência no tipo de amostras estudadas no âmbito médico-legal (Brinkmann *et al.*, 1996).

O elevado grau de polimorfismo destes microssatélites resulta da variação do número de unidades de repetição repetidas sequencialmente (em *tandem*) e de uma microvariação a nível de sequência ou da estrutura das unidades de repetição (Butler , 2005).

Atualmente a amplificação dos STRs é feita quase automaticamente, através de um sistema denominado PCR *multiplex*, que permite a amplificação de vários *loci* numa reação que ocorre num só tubo. Este método além de diminuir significativamente o tempo de processamento das amostras e a quantidade de reagentes e de DNA necessários, mostra-se ainda vantajoso pelo facto de eliminar eventuais fontes de contaminação e de evitar a troca de amostras (Schuez *et al.*, 2006). Além disso, um sistema complementar de

detecção fluorescente completa a automatização de todo processo e facilita a correta obtenção de perfis genéticos (Campam *et al.*, 2009).

O perfil genético de um indivíduo pode ser caracterizado a partir de vários STRs. Os marcadores utilizados neste estudo, incluem alguns dos validados e usados em todo o mundo, estando reunidos num kit desenvolvido por uma empresa comercial pelo fato de fazer parte dos STRs escolhidos pelas duas maiores potências mundiais (EUA e Inglaterra) das ciências forenses para construir as bases de dados nacionais de perfis genéticos (Martinez, 2009).

Os STRs que constituem o painel de marcadores genéticos forenses partilham um conjunto de características que lhe conferem uma elevada taxa de sucesso na resolução de casos de interesse médico-legal: elevada heterozigotidade e elevado grau de polimorfismo; elevado poder de discriminação, geralmente superior a 0,9 numa heterozigose superior a 70%; localização dispersa no genoma e segregação independente, com um posicionamento em diferentes cromossomas ou pelo menos em braços diferentes, estando a sua localização bem definida no cariótipo humano; localização em regiões não codificantes, não associadas a patologias; robustez e reprodutibilidade dos resultados quando analisados em sistemas *multiplex* (Romanova *et al.*, 2009).

1.5 ELETROFORESE CAPILAR

Para identificação de marcadores de DNA ou de proteínas utiliza-se a eletroforese. A técnica consiste em um meio de separação de substâncias utilizando um campo elétrico. O método tem numerosas aplicações e baseia-se no princípio de que substâncias de carga elétrica livre deslocam-se em sentido invariável. O processo tem sido amplamente usado para separação de fragmentos moleculares, em especial por haver uma seleção por peso molecular, ou melhor, pela sua carga líquida (Vieira, 2006; Góes, 2010).

Após amplificação por PCR, o comprimento total do fragmento amplificado é medido para determinar o número de repetições presentes em cada alelo encontrado no perfil de DNA. Esta medição do comprimento é feita através de uma separação por tamanho, envolvendo eletroforese em gel (GE) ou por um capilar (CE). Cada fragmento amplificado é marcado por fluorescência durante a PCR, uma vez que, tanto o *primer forward* quanto o *reverse* do loco específico contém um corante fluorescente. Assim, através da gravação com a cor do corante e o tempo de migração relativa de cada fragmento de DNA, comparados a um marcador padrão de tamanho interno, o tamanho de cada alelo STR pode ser determinado após a sua separação por tamanho (John M. Butler, 2007; Caetano, 2009).

A separação por eletroforese capilar combinada com excitação por laser de fluoróforos incorporado nos *amplicons* tem sido o método padrão para análises de STR e seqüenciamento de DNA por várias décadas. As principais vantagens deste método são a elevada eficiência de separação, o baixo consumo de amostra, com elevado rendimento através da análise paralela, e alta sensibilidade de detecção, que proporciona o laser induzido por fluorescência (LIF) (Oberacher, 2008). Contudo, os níveis de sobreposição espectral durante a excitação dos fluoróforo e das interações esféricas dos fluoróforos durante a síntese de DNA, dificultam a interpretação e limitam a quantificação dos dados. Métodos alternativos de avaliação de fragmentos de

DNA têm sido introduzidos, utilizando a técnica de espectrometria de massa (Planz *et al.*, 2012).

1.6 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração e a purificação dos ácidos nucleicos a partir de diversas amostras experimentais é uma etapa fundamental para obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam a reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA em sua forma original de dupla fita apresenta alta estabilidade e é muito resistente e se mantém inalterado em várias condições de meio. No entanto, alguns cuidados são aconselháveis, para que seja evitada a degradação das amostras obtidas no laboratório. A extração de DNA inclui basicamente dois procedimentos principais: a lise das células presentes na amostra e a purificação do DNA. Após a lise das células, o DNA deve ser separado dos restos celulares e das proteínas, precipitando o suspenso em volume adequado de água ultrapura ou soluções-tampão adequadas.

As amostras de DNA podem também ser submetidas a processos de concentração e purificação, com a finalidade de se obter melhores resultados nas amplificações. Para cada tipo de amostra, vários protocolos podem ser testados, adaptados e otimizados, de maneira a se conseguir DNA de boa qualidade (Shibata, 1992).

São várias as metodologias já descritas para extração do DNA genômico, porém as mesmas são normalmente demoradas e com muitas etapas, aumentando a probabilidade de falhas devido à excessiva manipulação. Estas diversas técnicas de extração apresentam uma necessidade comum: que o material genético dos organismos em questão esteja purificado (Gabek *et al.*, 2002), assim, são inúmeras as metodologias para extração de DNA, no entanto independentemente do método utilizado, a

finalidade dos protocolos de extração é resultar em um DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida e eficiente (Schulz *et al.*, 2006)

1.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA COM FENOL

O método mais utilizado para purificação do DNA é a extração com fenol tamponado, que provoca a desnaturação das proteínas de maneira eficiente. O clorofórmio também é usado como agente desnaturante das proteínas contidas na amostra. A mistura de fenol e clorofórmio é muito eficiente para desproteinizar e sua ação se fundamenta na propriedade hidrófoba das proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos. O álcool isoamílico previne a formação de espuma quando a mistura é agitada, o que torna mais fácil a separação da fase orgânica e da fase aquosa. A proteína que foi desnaturada pelo tratamento com fenol e clorofórmio forma uma camada na interface das duas fases, separando-se do DNA que se mantém na fase aquosa. A extração com fenol é dependente do pH. O fenol empregado nas extrações de DNA deve ter o pH próximo de 8,0 (fenol tamponado), já que faixas mais baixas de pH deslocam o DNA para a interface na hora da centrifugação. Em pH 7,0, ou acima, o DNA permanece na fase aquosa e em pH abaixo de 7,0, ele é desnaturado e migra para a fase orgânica.

Barea *et al.*, após comparar métodos de extração, afirma que, as extrações que apresentaram melhores resultados quantitativos são os que utilizaram solventes orgânicos, com fenol e clorofórmio.

Neste experimento, o DNA foi extraído pelo método orgânico (fenol-clorofórmio), e purificado com Kit de purificação de DNA Amicon® (Millipore), conforme protocolos em anexo. (ANEXO III).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade e a viabilidade do perfil de DNA de amostras sanguíneas em períodos de armazenamento pré-determinados, sendo estes 48 horas e 30 dias com e sem exposição ao reagente quimioluminescente luminol.

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Extrair DNA de amostras armazenadas (48 horas e 30 dias) expostas ou não ao reagente quimioluminescente, contendo sangue total e diluído nas concentrações de 1:1000; 1:10000 e 1:1000000.
2. Quantificar e comparar a concentração de DNA de amostras de tecido de algodão impregnadas com substância hematóide expostas ou não ao reagente quimioluminescente pela metodologia de PCR em tempo real, em períodos de armazenamento pré-determinados (48 horas e 30 dias);
3. Amplificar o DNA extraído utilizando marcadores do tipo STR situados nos cromossomos autossômicos com o kit AmpFISTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems).
4. Comparar a quantidade e especificidade dos perfis moleculares obtidos nas amostras submetidas a diferentes tempos de armazenamento e a exposição ao reagente quimioluminescente em relação às amostras não submetidas ao mesmo.
5. Avaliar estatisticamente os dados da quantificação de DNA nas amostras expostas ou não ao reagente, bem como as amostras contendo sangue total e diluído.

6. 3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Biologia e DNA Forense do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues (ICLR) da Superintendência de Polícia Técnico-Científica da Secretaria de Segurança Pública e Justiça do Estado de Goiás.

O experimento foi realizado utilizando amostras sanguíneas colhida com anticoagulante EDTA, de um único doador do gênero sexual feminino. Como suporte, foi utilizado tecido de algodão crú, previamente autoclavado, com tamanho de 1,0 X 1,0 cm², com um total de vinte unidades, conforme ilustrado na Tabela 01.

Tabela 01. Amostragem utilizada no experimento, suas diluições, controles e exposição ao reagente quimioluminescente.

Reagente Quimioluminescente	1/1000	1/10.000	1/1.000.000	CP⁺	CN⁺⁺	Total
Com aplicação	02	02	02	02	02	10
Sem aplicação	02	02	02	02	02	10
Total	04	04	04	04	04	20

CP⁺ : Controle positivo ; CN⁺⁺ : Controle Negativo

Em quatro suportes foi aplicado amostra contendo sangue total, em outros doze suportes foram realizadas diluições do sangue nas seguintes concentrações (1:1000,1:10.000 e 1:1.000.000), permanecendo armazenados por 48 horas à temperatura ambiente para secagem e o controle negativo foi realizado em quatro suportes sem aplicação de nenhuma substância.



Figura 3: Tecidos de algodão cru (1,0cm X 1,0 cm) autoclavados, contendo, da esquerda para direita, sangue total, diluição de 1:1000; 1:10.000 e 1:1.000.000 e controle negativo.

Após a secagem de todas as amostras à temperatura ambiente, dez delas foram submetidas a pulverização com o reagente luminol, o qual foi preparado de acordo com as orientações do fabricante, sendo aplicado em ambiente ao abrigo da luz (ANEXO I) e fotografado.

Das dez amostras, duas foram utilizadas como controle positivo e duas como controle negativo. No controle positivo foi impregnada amostra sanguínea sem diluição e como controle negativo, foi utilizado o tecido sem amostra sanguínea, seguindo os mesmos procedimentos citados acima.

A mesma amostragem, com o mesmo número de fragmentos de tecido impregnados com a mesma amostra sanguínea, nas mesmas diluições, sem a aplicação do reagente luminescente também foi utilizada como grupo controle.

Todas as amostras permaneceram armazenadas no laboratório de Biologia e DNA Forense em envelopes de papel distintos por 48 horas e 30 dias.

3.2. APLICAÇÃO DO REAGENTE QUIMIOLUMINESCENTE – LUMINOL

O reagente luminol foi preparado segundo as recomendações do fabricante e aplicado em ambiente ao abrigo da luz. Pulverizou-se em cada amostra e armazenou-se à temperatura ambiente, sendo que a pulverização foi feita de forma circular.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

O método mais utilizado para purificação do DNA é a extração com fenol tamponado, que provoca a desnaturação das proteínas de maneira eficiente. O clorofórmio também é usado como agente desnaturante das proteínas contidas na amostra. A mistura de fenol e clorofórmio é muito eficiente para desproteinizar e sua ação se fundamenta na propriedade hidrófoba das proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos. O álcool isoamílico previne a formação de espuma quando a mistura é agitada, o que torna mais fácil a separação da fase orgânica e da fase aquosa. A proteína que foi desnaturada pelo tratamento com fenol e clorofórmio forma uma camada na interface das duas fases, separando-se do DNA que se mantém na fase aquosa. A extração com fenol é dependente do pH. O fenol empregado nas extrações de DNA deve ter o pH próximo de 8,0 (fenol tamponado), já que faixas mais baixas de pH deslocam o DNA para a interface na hora da centrifugação. Em pH 7,0, ou acima, o DNA permanece na fase aquosa e em pH abaixo de 7,0, ele é desnaturado e migra para a fase orgânica.

Nogueira, 2004, após comparar métodos de extração, afirma que, as extrações que apresentaram melhores resultados quantitativos são os que utilizaram solventes orgânicos, com fenol e clorofórmio.

Neste experimento, o DNA foi extraído pelo método orgânico (fenol-clorofórmio), e purificado com Kit de purificação de DNA Amicon® (Millipore), conforme protocolos em anexo. (ANEXO III).

Todas as amostras foram extraídas pelo método orgânico e purificadas utilizando o Kit Amicon® (Millipore). O protocolo utilizado na extração encontra-se descrito no ANEXO II.

3.4. QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Os produtos da extração da molécula de DNA foram quantificados pela metodologia de PCR em tempo real, utilizando o Kit Plexor HY[®] (Promega) e o termociclador IQ5[®] Biorad. Os dados foram analisados utilizando os softwares Bio Rad IQ5 e Plexor Analysis (Promega), A presença de inibidores da reação de PCR foi avaliada utilizando o Internal PCR Control (IPC) do kit Plexor HY[®] (Promega).

Os dados foram analisados utilizando o Plexor[®] Analysis Softwares. O protocolo bem como os mapas de quantificação encontram-se descritos no ANEXO III.

3.5. AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Após a normalização do DNA na concentração recomendada pelo fabricante, as amostras foram amplificadas por PCR utilizando o Kit multiplex comercial que utiliza dezessete (17) marcadores moleculares do tipo STR com volume total da reação de 25 µL. As amostras foram concentradas em centrífuga a vácuo, ressuspensas e a amplificação foi realizada utilizando o kit AmpFISTR[®] NGM SElect[™] PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, 2011b,c). Este kit de amplificação utiliza mini-STRs formando amplicons com número menor de pares de bases que aumentam a possibilidade de amplificação em amostras degradadas. Os loci, localização cromossômica, escada alélica, marcadores fluorescentes podem ser analisados no Anexo IV.

Todas as amplificações do DNA foram realizadas no termociclador Gene Amp[®] PCR System 9700-Applied Biosystems[®]. A quantidade de ciclos, tempo de incubação e quantidade dos reagentes também seguiu a orientação do fabricante do kit.

3.6 ELETROFORESE E ANÁLISE DA AMPLIFICAÇÃO

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese capilar no equipamento ABI® 3130 Genetic Analyser-Applied Biosystems, utilizando polímero POP 4® (Applied Biosystems) e software de coleta de dados Genemapper Datacollection® (Applied Biosystems).

4. RESULTADOS

Imediatamente após a aplicação do reagente quimioluminescente em ambiente ao abrigo da luz, verificou-se uma luminescência tanto nas amostras impregnadas com sangue total quanto naquelas diluídas em 1:1.000 (Figuras 4 e 5).

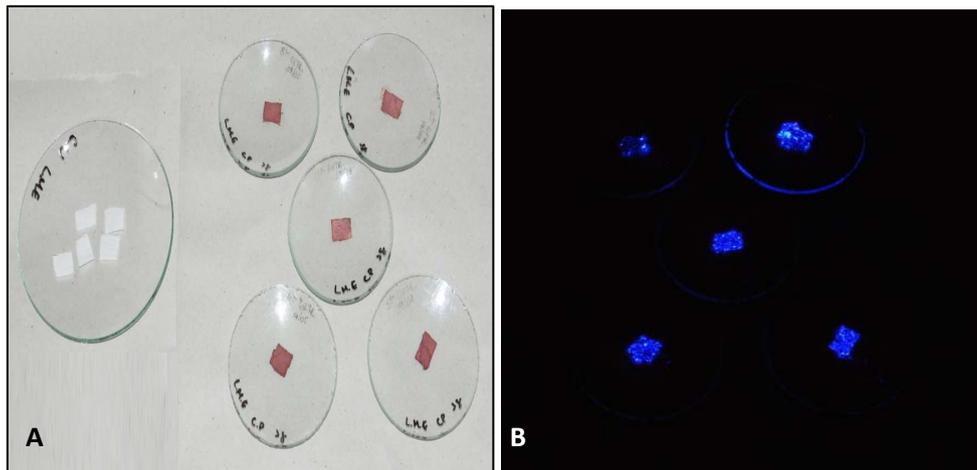


Figura 4. A: Controles negativo e positivo.
B: Positividade com luminescência.

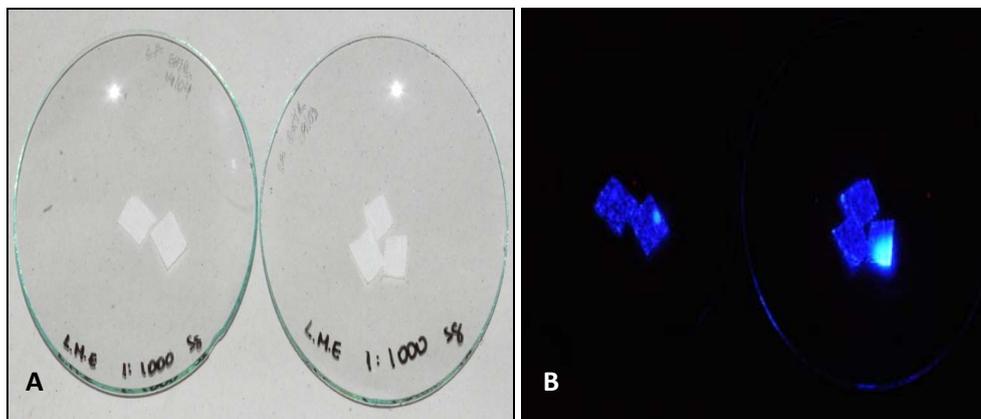


Figura 5. A: amostras diluídas na concentração de 1:1.000.
B: Luminescência observada nas amostras diluídas na concentração de 1:1.000.

As amostras diluídas em 1:10.000 não emitiram luminescência após a aplicação do reagente quimioluminescente (Figura 6).

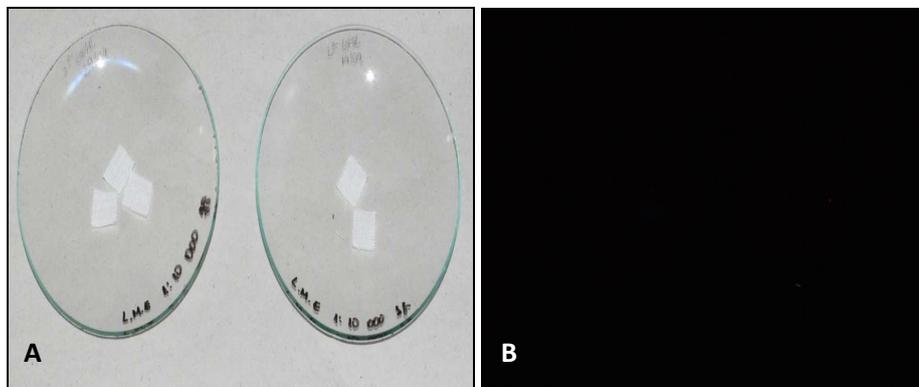


Figura 6. A: amostras diluídas em 1:10.000 antes da aplicação do reagente.
B: ausência de luminescência na diluição de 1:10.000 representada.

As amostras diluídas em 1:1.000.000, não apresentaram positividade de luminescência após a aplicação do reagente (Figura 7).

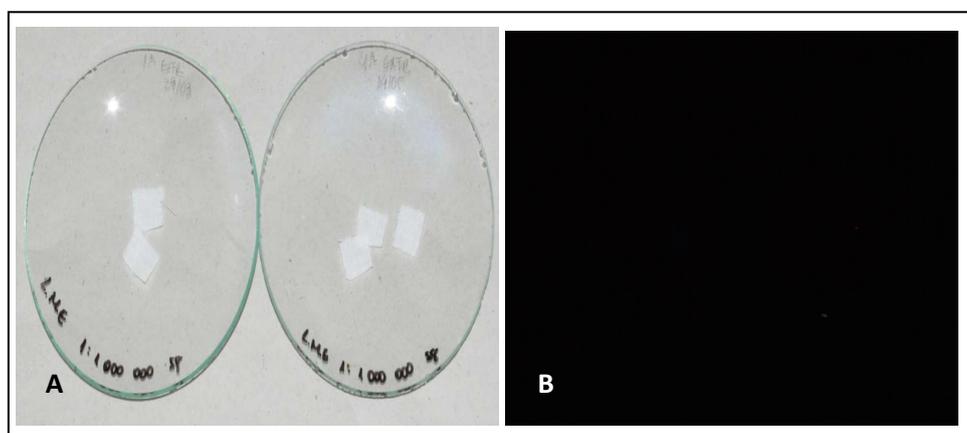


Figura 7. A: amostras diluídas em 1:1.000.000.
B: ausência de luminescência após aplicação do reagente quimioluminescente.

No presente estudo observamos que a quantificação do DNA extraído variou entre as amostras expostas ao reagente quimioluminescente com relação ao grupo controle, ou seja, sem exposição ao reagente. Na quantificação das amostras com 48 horas de armazenamento, a concentração de DNA foi maior no grupo controle (39,6 ng/μl), ou seja, nas amostras contendo sangue total e sem exposição ao reagente quimioluminescente. Comparando as amostras impregnadas com sangue total com as amostras diluídas, a concentração foi maior naquelas em que não havia diluição. Já nas amostras diluídas, as mais concentradas apresentaram maiores quantidades de DNA (Tabela 02 e Figuras 8 e 9).

Tabela 02. Quantificação do DNA em amostras contendo impregnação de substância hematóide com 48 horas de armazenamento, com e sem exposição ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle e em diferentes concentrações.

AMOSTRA 48 horas	SANGUE TOTAL (ng/μl)	AMOSTRA DILUÍDA (ng/μl)		
		1: 1000	1:10.000	1: 1.000.000
Com luminol	11,2	0,00963	0,00476	0,00273
Sem luminol	39,6	0,017	0,00429	0,00421

Nas amostras com 30 dias de armazenamento, as impregnadas com sangue total apresentaram resultado semelhante ao de quarenta e oito horas, ou seja, a amostra controle apresentou maior concentração de DNA em relação à amostra exposta ao reagente luminescente.

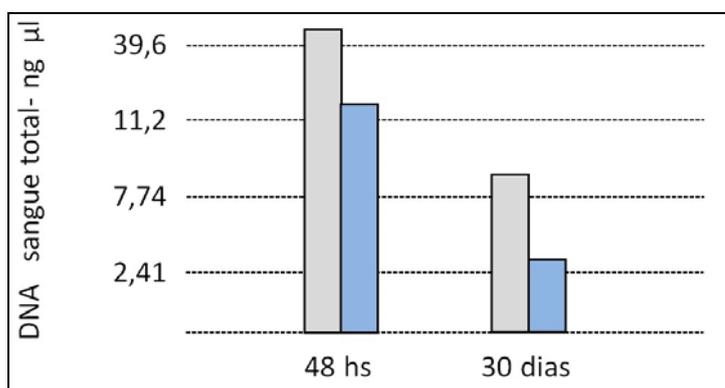


Figura 8. Concentração de DNA (ng/μl) das amostras contendo impregnação com sangue total em diferentes tempos de

armazenamento. Azul, amostras expostas ao reagente; Em cinza, amostras sem exposição ao reagente.

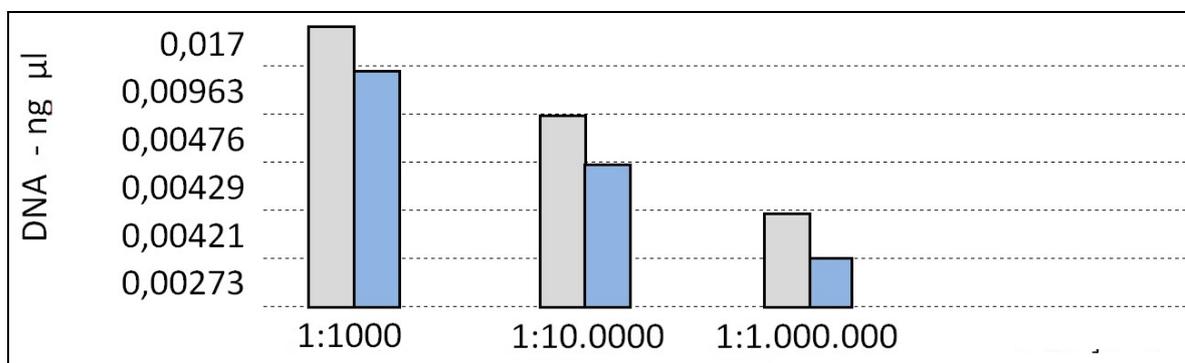


Figura 9. Quantificação das amostras de DNA nas primeiras 48 horas da aplicação do reagente, em relação ao grupo controle. Azul, amostras expostas ao reagente; Em cinza, amostras sem exposição ao reagente.

Nas amostras diluídas, as de menores concentrações, bem como sem exposição ao reagente quimioluminescente, apresentaram maiores concentrações da molécula de DNA. Estes resultados podem ser observados na Tabela 03 e na Figura 10.

Tabela 03. Quantificação do DNA em amostras contendo impregnação de substância hematóide com 30 dias de exposição ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle em diferentes concentrações.

AMOSTRA	SANGUE TOTAL (ng µl)	AMOSTRA DILUÍDA (ng µl)		
		1:1000	1:10.000	1:1.000.000
Sem luminol	7,74	0,0154	0,00513	0,00328
Com luminol	2,41	0,000808	0,00267	0,00208

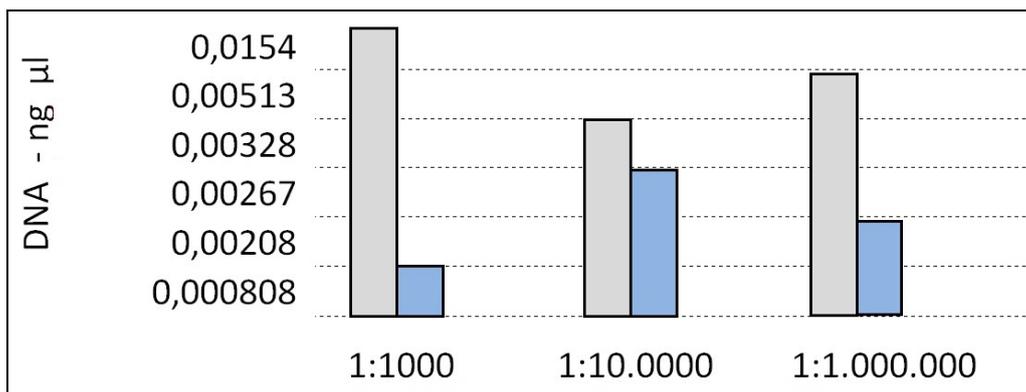


Figura 10. Quantificação das amostras diluídas após 30 dias da aplicação do reagente, em relação ao grupo controle sob mesmas concentrações. Azul, amostras expostas ao reagente; em cinza, amostras sem exposição ao reagente.

Após a amplificação foi observado que nas amostras contendo sangue total com 48 horas de armazenamento e sem exposição ao reagente quimioluminescente, houve amplificação de todos os *loci* analisados, conforme se evidencia na Tabela 04 e na Figura 18.

Já nas amostras diluídas, observamos perfis que evidenciam degradação da molécula de DNA, com perfil parcial nos *loci* analisados. Na amostra diluída na proporção de 1:10.000 e 1:1.000.000 não foi observado amplificação em nenhum dos *loci*.

O perfil molecular da amostra controle sem a exposição ao reagente à base de luminol foi utilizado como referência para o confronto com os perfis moleculares observados nas demais amostras.

Tabela 04. *Loc*i amplificados e alelos observados nas amostras contendo impregnação com sangue total e em diferentes diluições com 48 horas de armazenamento sem exposição ao reagente quimioluminescente.

<i>Loci</i>	Alelos observados			
	Sangue total	1:1.000	1:10.000	1:1.000.000
D10S1248	14 – 15	14 – 15 – 16	-	-
vWA	16 – 17	15 - 16 – 17	-	-
D16S539	10 – 11	10 – 11	-	-
D2S1338	25 – 25	25 – 25	-	-
Amelogenina	X – X	X – X	-	-
D8S1179	10 – 11	10 – 11 - 12	-	12
D21S11	28 – 29	28 – 29	-	-
D18S51	13 – 14	-	-	-
D22S1045	11 – 16	11- 16 – 17	-	16
D19S433	14 - 14.2	-	-	-
TH01	6 - 9.3	6 – 9.3	-	-
FGA	24 - 24.2	-	-	-
D2S441	10 – 11	10 – 11	-	-
D3S1358	15 – 15	15	-	-
D1S1656	16.3 – 18.3	18.3	-	-
D12S391	17 – 22	-	-	-
SE33	27.2 – 28.2	-	-	-

A Figura 11 ilustra o perfil molecular obtido da amostra identificada como A2 - com 48 horas de armazenamento, sem o uso do reagente à base de luminol da amostra com sangue total. Observa-se a amplificação de todos os *loci* analisados com confirmação do gênero sexual do doador da amostra. Este perfil foi utilizado como referência para as demais amplificações.

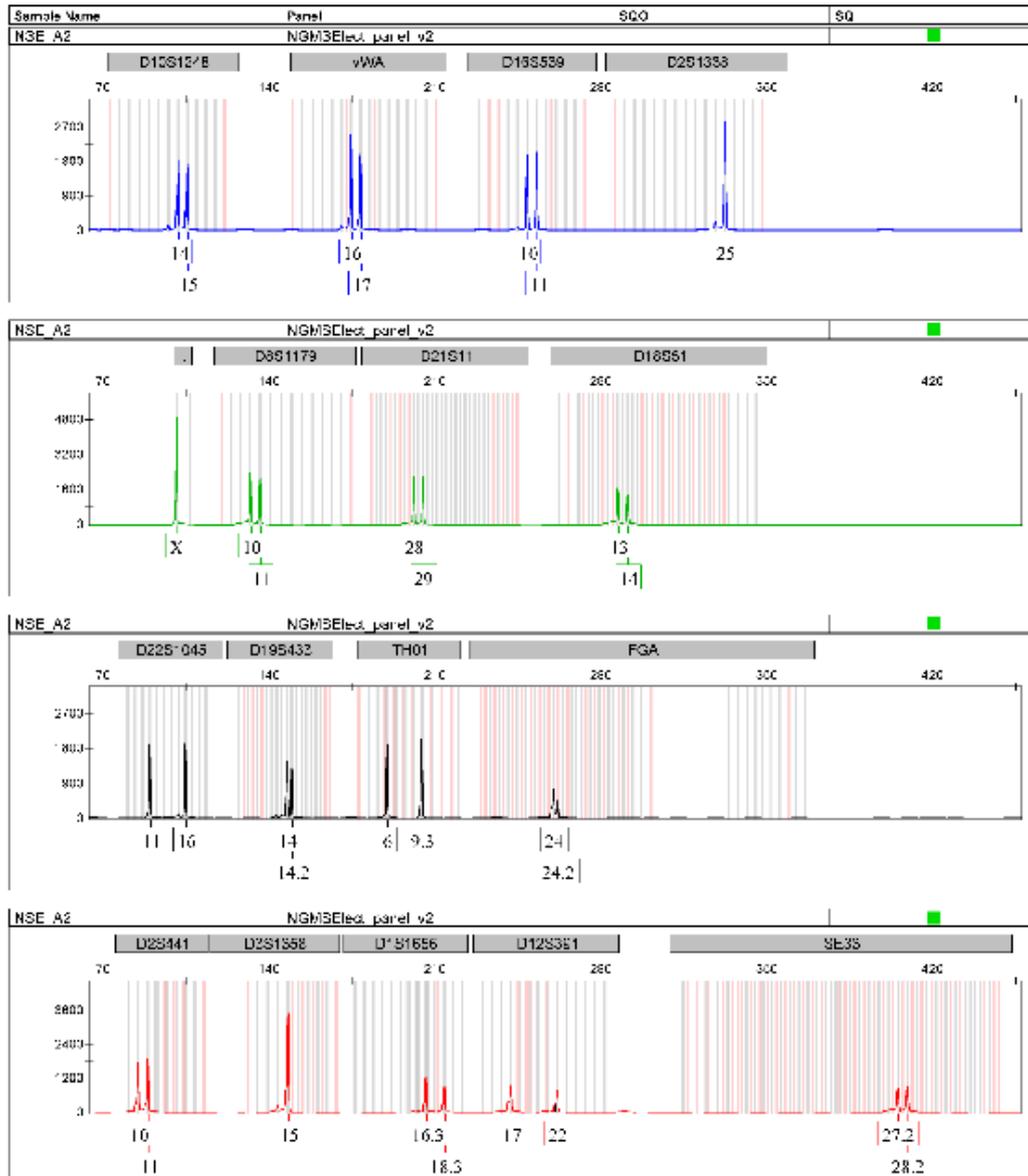


Figura 11: Perfil molecular obtido da amostra identificada como A2 - com 48 horas de armazenamento, sem o uso do reagente à base de luminol da amostra com sangue total. Observa-se a amplificação de todos os *loci* analisados com confirmação do gênero sexual do doador da amostra.

Semelhante ao resultado das amostras armazenadas em 48 horas e sem exposição ao reagente quimioluminescente, às amostras com 48 horas e

com exposição ao reagente à base de luminol e armazenadas pelo mesmo tempo mostraram identidade de perfis, ou seja, amplificação compatível em todos os *loci* analisados (Tabela 05). O resultado da amplificação das amostras diluídas em 1:10.000 e 1:1.000.000 foi negativo, ou seja, nenhuma amplificação foi observada. Já na diluição de 1:1000 observamos amplificação de alguns *loci*, com a caracterização do gênero sexual do doador da amostra, mas o restante dos marcadores moleculares apresentaram o perfil observado diferente do perfil referência, caracterizando degradação da amostra.

Tabela 05. *Loci* amplificados e alelos observados nas amostras contendo impregnação com sangue total e em diferentes diluições com 48 horas de armazenamento com exposição ao reagente quimioluminescente.

<i>Loci</i>	Alelos observados			
	Controle	1:1.000	1:10.000	1:1.000.000
D10S1248	14 – 15	15 – 16	-	-
Vwa	16 – 17	14 – 15	-	-
D16S539	10 – 11	11 – 12	-	-
D2S1338	25 – 25	-	-	-
Amelogenina	X – X	X – X	-	-
D8S1179	10 – 11	10 – 12	-	-
D21S11	28 – 29	29 – 30	-	-
D18S51	13 – 14	15	-	-
D22S1045	11 – 16	16 – 17	-	-
D19S433	14 - 14.2	14 – 15	-	-
TH01	6 - 9.3	6	-	-
FGA	24 - 24.2	22 – 25	-	-
D2S441	10 – 11	11	-	-
D3S1358	15 – 15	15 – 16	-	-
D1S1656	16.3 – 18.3	12	-	-
D12S391	17 – 22	-	-	-
SE33	27.2 – 28.2	-	-	-

Já nas amostras com 30 dias de armazenamento observamos o mesmo padrão de amplificação na amostra impregnada com sangue total sem exposição ao reagente. Já nas amostras com diluição observamos perfis moleculares degradados em quase todos os marcadores moleculares analisados, ou seja, amplificação inespecífica, conforme mostrado na Tabela 06 e Figura 12.

Tabela 06. *Loci* amplificados e alelos observados nas amostras contendo impregnação com sangue total e em diferentes diluições com 30 dias de armazenamento sem exposição ao reagente quimioluminescente.

<i>Loci</i>	Sangue total	Alelos observados		
		1:1.000	1:10.000	1:1.000.000
D10S1248	14 – 15	14 – 15 – 16	14 – 15 – 16	14 – 15 – 16
vWA	16 – 17	14 – 15 – 16 – 17	14 – 15 – 17	16 – 17
D16S539	10 – 11	10 – 11 – 12	11 – 12	10 – 11
D2S1338	25 – 25	16 – 18 – 25	16 – 18 – 25	-
Amelogenina	X – X	X – X	X – X	X – X
D8S1179	10 – 11	10 – 11 – 12	10 – 11 – 12	10 – 11
D21S11	28 – 29	28 – 29 – 30	28 – 29 – 30	28 – 29
D18S51	13 – 14	13 – 14 – 15 – 16	14	13
D22S1045	11 – 16	11 – 16 – 17	11 – 16 – 17	11 – 16
D19S433	14 - 14.2	14 – 14.2 – 15	14 – 14.2 – 15	14 – 14.2
TH01	6 - 9.3	6 – 9.3	6	6 – 9.3
FGA	24 - 24.2	22 – 24 – 24.2 – 25	22	-
D2S441	10 – 11	10 – 11 – 11.3	10 – 11 – 11.3	10 – 11
D3S1358	15 – 15	15 – 16	15 – 16	15
D1S1656	16.3 – 18.3	12 – 15 – 16.3	12 – 15 – 18.3	16.3 – 18.3
D12S391	17 – 22	17 – 18 – 19 – 22	17 – 18 – 19 – 22	17 – 22
SE33	27.2 – 28.2	15 – 24.2 – 27.2 – 28.2	15 – 27.2 – 28.2	-

Já nas amostras com 30 dias de armazenamento e expostas ao reagente quimioluminescente observamos que as diluições mostraram perfis moleculares incompletos e degradados em relação à amostra de sangue total (Tabela 07 e Figura 12). A amostra de sangue total apresentou amplificação em todos os marcadores moleculares com identidade de perfil com o doador.

Tabela 07. *Loci* amplificados e alelos observados nas amostras contendo impregnação com sangue total e em diferentes diluições com 30 dias de armazenamento com exposição ao reagente quimioluminescente.

<i>Loci</i>	Alelos			
	Sangue total	1:1.000	1:10.000	1:1.000.000
D10S1248	14 – 15	14 – 14	15 – 16 – 18	12 – 15
vWA	16 – 17	-	14 -15	-
D16S539	10 – 11	-	11 – 12	11 -11
D2S1338	25 – 25	-	16 – 18	22 – 22
Amelogenina	X – X	X – X	X – X	X – X
D8S1179	10 – 11	-	12 – 12	12 – 13
D21S11	28 – 29	-	29 – 30	-
D18S51	13 – 14	-	15 – 16	-
D22S1045	11 – 16	-	15 – 16 – 17	-
D19S433	14 - 14.2	-	14 – 15	14 – 15
TH01	6 - 9.3	-	6 – 6	6
FGA	24 - 24.2	-	22 – 25	-
D2S441	10 – 11	11 – 11	10 – 11 – 11.3	11 – 11.3
D3S1358	15 – 15	-	15 – 16	15
D1S1656	16.3 – 18.3	-	12 – 15	-
D12S391	17 – 22	-	18 – 19	-
SE33	27.2 – 28.2	-	15 – 15	15 – 24.2

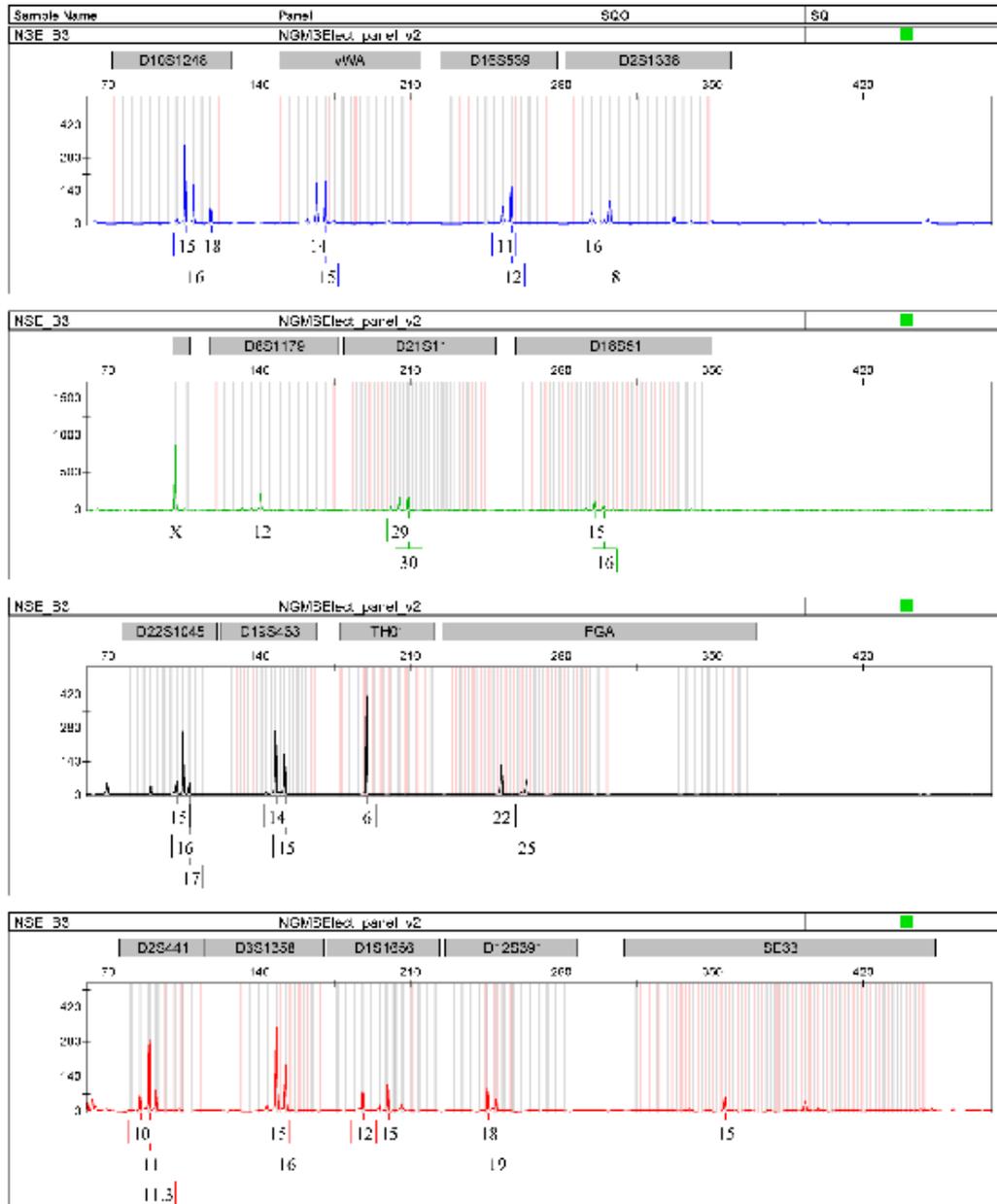


Figura 12: Perfil molecular obtido da amostra identificada como B3 - com 30 dias de armazenamento, com o uso do reagente à base de luminol. Observa-se amplificação inespecífica na maioria dos *loci* analisados com confirmação do gênero sexual do doador da amostra.

Nas amostras identificadas como controle negativo não foi observado amplificação de nenhum dos *loci* analisados (Figura 13).

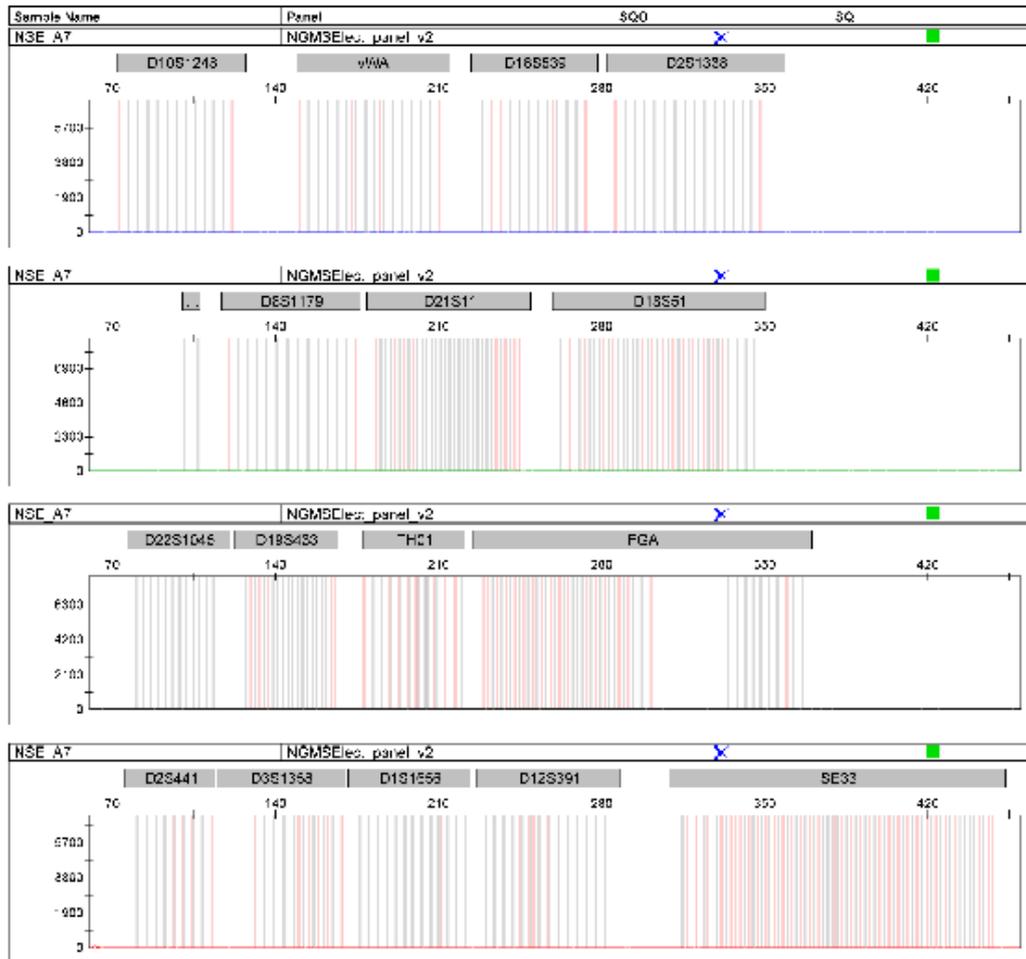


Figura 13. Perfil molecular obtido da amostra identificada como A7 – controle negativo, com 30 dias de armazenamento, com o uso do reagente à base de luminol. Observa-se ausência de amplificação em todos os *loci* analisados.

Quanto ao número total de *loci* amplificados, observamos que somente nas amostras de sangue total - controle, ou seja, sem diluição do material, foram observados perfis completos. Nas amostras diluídas, somente a amostra com diluição de 1:1000, sem exposição ao reagente apresentou identidade no *loci* da amelogenina. Nas demais amostras contendo diluição do material com ou sem exposição ao reagente quimioluminescente, comparadas aos perfis das amostras controle, apresentaram ausência de um perfil completo e ainda, apresentaram perfil molecular degradado impossibilitando a realização de confronto de perfis genéticos (Tabela 08 e 09).

Tabela 08. *Loc*i amplificados nas amostras contendo impregnação de substância hematóide com 48 horas de armazenamento comparado ao grupo controle em diferentes concentrações.

AMOSTRA	<i>Loc</i> i amplificados			
	Sangue total	1:1000	1:10.000	1:1.000.000
Sem luminol	17	01	-	-
Com luminol	17	-	-	-

Tabela 09. *Loc*i amplificados nas amostras contendo impregnação de substância hematóide com 30 dias de armazenamento e expostas ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle em diferentes concentrações.

AMOSTRA	<i>Loc</i> i amplificados			
	Sangue total	1:1000	1:10.000	1:1.000.000
Sem luminol	17	01	01	01
Com luminol	17	01	-	01

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação dos dados foi utilizado o teste estatístico t student. Para os valores quantificados de DNA em amostras com 48 horas de armazenamento, com e sem exposição ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle e em diferentes concentrações, não há diferença estatisticamente significativa ($p=0,51$) nas amostras tratadas com luminol e sem o reagente. As amostras com sangue total apresentaram 3.5 vezes mais DNA naquelas não expostas ao reagente. Já as amostras com diluição, a estatística revela que as diluídas na concentração de 1:1.000, mostrou 1.7 vezes mais DNA nas amostras não expostas ao reagente quimioluminescente comparadas àquelas submetidas ao reagente. Nas amostras com diluição de 1:10.000, praticamente tem-se a mesma quantidade de DNA e nas amostras diluídas em 1:1.000.000 tem-se 1.5 vezes mais DNA em amostras sem o reagente.

Com relação à quantificação da concentração de DNA nas amostras contendo impregnação de substância hematóide com 30 dias de exposição ao reagente quimioluminescente comparado ao grupo controle, ou seja, sem exposição ao reagente, em diferentes concentrações, não foi observado diferença estatisticamente significativa ($p=0,53$). As amostras impregnadas com sangue total apresentaram 3.2 vezes mais DNA em relação àquelas não expostas ao reagente quimioluminescente. Já nas amostras com diluição, as amostras diluídas na concentração de 1:1.000, mostrou 1.9 vezes mais DNA nas amostras sem luminol comparadas às submetidas à exposição ao reagente luminescente, bem como as diluídas em 1:10.000. As amostras diluídas na concentração de 1:1.000.000 foi observado 1.6 vezes mais DNA em amostras sem a aplicação do reagente.

6. DISCUSSÃO

O laboratório de DNA Forense do ICLR possui uma grande quantidade de casos considerados “fechados – amostra referência e questionada” e “abertos – amostras questionadas” para análise, aliado à grande cobrança para emissão de laudos desses casos. Fazendo parte dessa estatística estão casos criminais em que o perito de local utilizou o reagente quimioluminescente e o caso está armazenado no laboratório aguardando a ordem cronológica de análise.

Segundo Vaz (2008), Baraccati (2009) e Rabello (2011) o interesse médico-legal da criminalística reside no fato de se procurar vestígios anatômicos, biológicos ou humorais que permitam estabelecer a identidade do autor do crime. Nas ocorrências de morte violenta, a amostra sanguínea é um dos vestígios mais comuns em locais de crime sendo que em alguns locais existe a tentativa de adulteração para se apagar os vestígios ali deixados.

As evidências recolhidas em locais de crime têm que ser analisadas. As análises forenses baseiam-se, sobretudo, nas técnicas e métodos da Imunologia, Química, Biologia Molecular, Química Analítica, Bioquímica, bem como na Microscopia, Cristalografia, Cromatografia, Fluorescência, Fosforescência entre outros (Vaz, 2008). Uma amálgama de princípios de técnicas que são adaptadas das outras ciências para ser possível a sua utilização na área forense, uma vez que a amostragem é bastante diferente da das outras ciências (Vaz *et al.*, 2009).

Contudo, problemas únicos podem suceder considerando que os cientistas forenses lidam com amostras ou vestígios com história desconhecida e muitas delas, degradadas, contaminadas ou outros desafios ambientais (Bonaccorso, 2005.,Pardini 2005).

Adicionalmente, as quantidades de amostras recolhidas não são as ideais que permitam métodos analíticos ou clínicos standardizados, portanto,

os cientistas forenses vêm-se obrigados a criar protocolos analíticos que vão de encontro às suas necessidades/circunstâncias especiais (Vaz, 2008; Khan, 2009).

Os testes presuntivos para detecção de sangue devem ser incluídos no procedimento operacional padrão das equipes periciais, pois esta etapa é sinônimo de celeridade e economia na perícia realizada (Oliveira *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2012).

Portanto, faz-se necessária uma análise mais minuciosa, com isolamento do local do crime e a utilização de reagentes quimioluminescentes para se verificar o “modus operandi” utilizado no local. Shanan *et al.* (2007) concluiu que o melhor teste presuntivo de sangue total foi no método em que se foi utilizado o reagente à base de luminol.

A utilização desses reagentes à base de luminol nos plantões da Polícia Técnico-Científica é considerada de rotina proporcionando inúmeras respostas em locais de crime. Barni *et al.*(2007) e Frigeri *et al.* (2013) relatam a relevância do reagente à base de luminol para área forense devido à sua alta sensibilidade sendo um sistema para detecção de manchas de sangue latentes de fácil manuseio.

Resultados semelhantes também foram observados por Kalapothakis (2011), Vidotto (2010) e Queiroz (2010) os quais relatam que o reagente quimioluminescente é tido como a melhor escolha para detectar manchas de sangue frescas e latentes e, para este último tipo, sua capacidade para localizar manchas envelhecidas e não visíveis a olho nu lhe confere vantagem frente às demais técnicas não quimioluminescentes, além de possuir alta sensibilidade e limite de detecção extremamente pequeno.

Na rotina pericial inúmeras amostras são analisadas com o objetivo de se obter o perfil molecular, dentre elas, roupas com sangue ou sêmen; sangue coletado de armas ou de veículos envolvidos em crimes; sangue revelado por luminol em roupas, estofamentos ou outros revestimentos; esfregaços oral, vaginal ou anal de vítimas de violência sexual; amostras encontradas em corpos carbonizados ou em ossadas (Marluzzo, 2013).

Domênico *et al.* (2012) relata a eficiência do reagente à base de luminol na investigação criminal e seu mecanismo de ação. Através de diversas pesquisas constatou-se que ele consegue detectar concentrações extremamente pequenas de sangue em diversas superfícies, mesmo depois de diversas lavagens e após anos expostos a fatores ambientais. Rocquefelte (2006) relata que somente a detecção visual não garante a tipagem de DNA bem sucedida. Conclui que o novo reagente luminol tem se mostrado muito eficaz em análises forenses para localizar manchas de sangue lavadas ou diluídas sendo rotineiramente utilizado nas análises forenses de vários países como a França.

Santos (2011), Drotz (2008) e Nilsson (2008) também demonstraram que o luminol é um composto eficiente para detectar manchas de sangue frescas e latentes e, para este último tipo é tido como a melhor escolha, pois sua capacidade para localizar manchas envelhecidas e não visíveis a olho nu lhe confere vantagem frente às demais técnicas não quimioluminescente, além de possuir alta sensibilidade e limite de detecção extremamente pequeno.

Medir com qualidade é uma exigência da sociedade e, na rotina forense considerada de triagem para os passos seguintes à extração, dessa forma, esta demanda alcança os produtos e serviços relacionados à Ciência Forense, isto é, aqueles relacionados a aplicação de ciências a matéria ou problemas legais, em especial penal. Entre essas ciências, atualmente, apresenta papel de destaque a identificação humana por DNA (Garrido & Giovanelli, 2011).

As técnicas atuais de biologia molecular utilizadas em identificação humana demandam a prévia determinação da concentração do DNA. Com isso, vários métodos são propostos para a quantificação desse material em uma amostra. Contudo, a grande maioria dos métodos resulta em determinações relativas, com valor vinculado a um calibrador, tomado como padrão (Vallone *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2008).

Todavia, uma das ferramentas mais utilizadas em laboratórios médicos e forenses é a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Uma grande variedade de métodos de qPCR foram desenvolvidos nos

últimos anos, especialmente para uso em amostras forenses (Kline *et al.*(a), 2005).

Uma correta quantificação do material genético humano é essencial em amostras forenses que, em geral são exíguas, deterioradas e contaminadas com inibidores de PCR (Giovanelli, 2013). A exatidão na quantificação da amostra é também requisito essencial para as técnicas posteriores a extração, onde se determina o perfil genético. De forma bastante generalizada, uma das técnicas utilizadas pelos laboratórios forenses é a amplificação do DNA por meio de PCR com múltiplos marcadores de short tandem repeats (STR) para posterior separação por meio de eletroforese capilar e análise (Butler, 2010).

Embora grande parte das análises forenses seja de natureza qualitativa, muitas vezes medidas quantitativas em etapas prévias são necessárias para garantir a qualidade dos resultados obtidos. Especialmente na área de DNA forense, cujo alto poder de individualização é suficiente para garantir seu valor probante, o rigor profissional deve ser ainda maior na obtenção de resultados (Nielsen *et al.*, 2008).

A quantificação do DNA utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real fornece uma quantificação dinâmica superior aos outros métodos, aumentando a objetividade da interpretação (Krenke *et al.*, 2008). Análises semelhantes desta metodologia realizadas por Sawazaki (2013) concluiu que utilizar o sistema de PCR em Tempo Real com Taqman, pelo uso do sistema com SYBR Green ou o BRYTTM Green, se revela um método de mais baixo custo, altamente eficiente, permitindo a solicitação da ISO 17025 pelo laboratório.

Nas amostras impregnadas com sangue total, tanto nas armazenadas por 48 horas quanto em 30 dias, com ou sem a exposição a reagentes quimioluminescentes mostraram uma concentração de DNA maior em relação às amostras diluídas. Este resultado também foi observado em relação às amostras diluídas, onde foi observado que, na medida em que se diluía a amostra, uma menor concentração de DNA era obtida, além de ser encontrada uma maior quantidade de DNA nas amostras nominadas controle em relação às amostras diluídas.

Com a quantificação de todas as amostras pode-se inferir que já nas primeiras 48 horas de armazenamento, tem-se perda de material genético, e essa perda se mostrou progressiva com o passar do tempo e com a aplicação do reagente quimioluminescente, demonstrado nas figuras 12, 13 e 14. Esses dados sugerem a degradação da molécula de DNA expostas ao reagente quimioluminescente em relação ao grupo sem exposição. Resultados semelhantes da quantificação após a exposição ao reagente luminol foram obtidos por Almeida *et al.* (2010).

As amostras foram submetidas a PCR utilizando um sistema multiplex para amplificação e eletroforese capilar para análise de perfil através de eletroferogramas, com o intuito de se saber se, apesar desses resultados quantitativos diferenciados, ainda se pode ter perfil genético satisfatório, bem como, se os dados quantificados se confirmam através dos perfis. Sebastiany (2012) e Bazzali (2009) relatam que os processos forenses necessitam de dois ou vários dias para serem executados, sendo que o método multiplex gera um rendimento substancialmente maior que as técnicas convencionalmente utilizadas. Este disponibiliza implicações significantes de análises das amostras forenses de baixo custo, e rapidez na disponibilização dos resultados.

O desenvolvimento de protocolos de PCR multiplex e a implementação de ferramentas de software para apoiar a interpretação dos dados são necessários para agilizar o processo e ajudar as técnicas de PCR a estabelecer-se como a tecnologia de tipagem em DNA forense de rotina. O sistema aumenta a velocidade, reduz custos e maximiza a eficiência nas análises forenses, melhorando a resolução e precisão dos resultados (Bazzali, 2009).

Quanto aos perfis moleculares obtidos, as amostras impregnadas com sangue total apresentaram perfis completos em todos os marcadores analisados. O marcador de gênero sexual confirmou que a amostra era de um doador do sexo feminino. A seleção dos marcadores moleculares mini-STRs em muito contribuiu para o sucesso desses perfis, que também foram observados por Castro *et al.* (2008) no qual houve a geração de produtos de

amplificação muito maiores aos comparados, permitindo estudo e análise de material degradado.

Resultados contrastantes com nossa pesquisa (Castro *et al.*,2008; Almeida *et al.*, 2010; Bárabro *et al.*, 2007, Shanan *et al.*, 2007 e Domênico *et al.*, 2012), indicaram que não existem diferenças entre os resultados de amplificação das amostras sem o tratamento prévio com luminol e aquelas que foram testadas com o reagente, o que comprova que o luminol não interfere na análise de DNA por PCR.

Corroborando com nossos resultados, Domênico *et al.* (2012) e Chemello (2007) relataram a sensibilidade do luminol pode chegar aos impressionantes 1:1.000.000.000, mesmo em locais os quais tenham sido lavados e que a reação química não afeta a cadeia de DNA. Já Nilsson (2006) e Barni *et al.*(2007) relatam que o tratamento com luminol não parece ter um efeito inibidor grave na análise por PCR. Existe um risco de degradação do DNA, que aumenta com a exposição prolongada da mancha de sangue pulverizada com o reagente.

Experimentos realizados por Swango *et al.* (2013) mostram que o DNA extraído a partir de amostras forenses se encontra com frequência em estado de degradação, o que afeta a análise de maneira significativa, resultados também encontrados em nossa pesquisa.

Giovanelli (2013) e Curran (2009) mostraram que trabalhar com concentrações desconhecidas, ou não confiáveis, pode acarretar em não obtenção de resultados ou em resultados duvidosos. Para evitar tais problemas, a produção de um Material de Referencia Certificado (MRC) nacional para quantificação de DNA faz-se inadiável.

A análise estatística não demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao tempo de exposição (48 horas e 30 dias) nas amostras com e sem exposição ao reagente quimioluminescente. Já na quantidade de loci amplificados, as amostras diluídas apresentaram quantidades distintas em função da diluição sendo que as amostras mais concentradas apresentaram um maior número de loci amplificados. Foi observado inespecificidade dos alelos amplificados, bem como, ausência de

amplificação nos marcadores moleculares analisados nas amostras diluídas em relação as amostras sem diluição.

Portanto, em função dos resultados obtidos na quantificação de DNA aliados à geração de perfis moleculares inespecíficos, as evidências hematóides de locais de crime expostas ao reagente quimioluminescente devem ser analisadas o mais breve possível, reduzindo ao máximo o tempo de armazenamento para minimizar os efeitos do reagente sobre a molécula de DNA, bem como a orientação para o perito criminal selecionar amostras mais concentradas no local de crime para a obtenção de um melhor resultado.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, podemos concluir que nos intervalos de armazenamento de 48 horas e 30 dias, foi observado que:

1. A quantificação do DNA extraído por PCR em tempo real revelou uma maior concentração de DNA nas amostras com sangue total expostas ou não ao reagente quimioluminescente, bem como nas amostras menos diluídas;
2. As amostras foram amplificadas utilizando marcadores moleculares do tipo STR situados nos cromossomos autossômicos (kit AmpFISTR® NGM SElect™ PCR Amplification Kit - Applied Biosystems) obtendo perfis completos e incompletos conforme a qualidade e quantidade de DNA da amostra analisada.
3. O aumento do tempo de armazenamento, bem como a exposição ao reagente luminol, proporcionaram a obtenção de perfis incompletos e ausentes.
4. As amostras impregnadas com substância hematóide coletadas em locais de crime expostas ao reagente luminol devem ser analisadas o mais breve possível diminuindo a ausência de amplificação e a obtenção de perfis inespecíficos.
5. Os resultados observados na quantificação de DNA por PCR em tempo real tanto nas amostras armazenadas com 48 horas e 30 dias, bem como, nas amostras concentradas e diluídas, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas pelo teste estatístico *t* de student.

7. ANEXOS

ANEXO I. PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DO LUMINOL

1. Adicionar o pó de luminol ao líquido incolor contido no frasco borrifador;
2. Agitar até que o pó se dissolva completamente, caracterizando o líquido com uma cor amarelada.

ANEXO II. PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi extraído pelo método orgânico (fenol-clorofórmio), e purificado com AMICOM ,conforme protocolos em anexo. (ANEXO 2).

1. Adicionar a um fragmento da amostra, 300 microlitros de Tampão de Extração de Manchas (SEB), 7,5 microlitros de Proteinase K e 11 microlitros de DTT – vórtex por 10s;
2. Incubar a 56°C por 18-24 hs;
3. Retirar o vestígio (utilizar cesta separadora e centrifugar 5 minutos a 12 000 RPM);
4. Adicionar 300 microlitros de Clorofane a cada amostra utilizando pipeta de repetição sem a necessidade de ponteira – vórtex;
5. Centrifugar 5 minutos a 12 000 RPM;
6. Identificar igualmente dois tubos ependorf da caixa amicom e colocar o tubo amicom em um deles. Tampar o outro e deixar para recuperação do DNA no final do procedimento;
7. Transferir a fase aquosa (superior) para a unidade concentradora Amicon;
8. Centrifugar a 14 000 g por 20 minutos;
9. Adicionar 300 microlitros de água ultrapura À unidade concentradora Amicon e centrifugar a 14 000 g por 20 minutos;
10. Adicionar 40 microlitros de água estéril sobre o Amicon (Neste momento troca-se de microtubo e vira-se a membrana concentradora);
11. Inverter o tubo Amicon, no eppendorf identificado anteriormente, e recuperar o DNA centrifugado a 1 000g por 2 minutos e incubar a 56° antes de amplificar.

ANEXO III. PROTOCOLO DE QUANTIFICAÇÃO

	Secretaria da Segurança Pública e Justiça Superintendência de Polícia Técnico-Científica Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues Laboratório de Biologia e DNA Forense	POP Nº ICLR.SEBIO.O.63
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO- POP Análise de resultados da quantificação de DNA por PCR em tempo real utilizando o kit Plexor HY (Promega)	REVISÃO nº 0001 Página 69 de 110

1. Objetivos:

- a. **Geral:** *Sistematizar e padronizar a rotina de trabalho, contribuindo para a melhoria na qualidade dos processos, favorecendo a seleção adequada de recursos e ferramentas necessárias à execução do serviço, colaborando para aplicação das normas de segurança no ambiente de trabalho, facilitando o processo de capacitação profissional e a comunicação efetiva no local de trabalho.*
- b. **Específico:** Analisar os resultados da quantificação de DNA por PCR em tempo real utilizando o kit Plexor HY (Promega).

2. Campo de Aplicação:

Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues.

3. Definições, siglas e abreviaturas

- **DNA:** ácido desoxirribonucléico - composto orgânico que contém instruções genéticas
- **PCR:** reação em cadeia da polimerase
- **NTC:** controle negativo da reação (água ultra-pura)
- **IPC:** Controle interno de DNA para monitorar eficiência da amplificação e detectar a presença de inibidores.
- **Tm:** Temperatura de anelamento ou *melting*
- **Ct:** limite para detecção de início de amplificação do DNA (RFU)
- **RFU:** nível de fluorescência

- **Número de LD:** número de registro da amostra e do laudo de DNA resultante.

4. Recursos necessários:

- Computador acoplado ao equipamento iQ5 (Biorad) contendo os softwares Bio-Rad IQ5 e Plexor Analysis (Promega)
- Pen-drive formatado
- Computador contendo o programa Plexor Analysis (Promega) acoplado a uma impressora.

5. Procedimento:

Exportar os resultados

- 5.1. Selecionar a opção “*PCR Quant*” no canto superior esquerdo da tela. Na função “*Results*”, selecionar “*Background subtracted > Analysis mode*”;
- 5.2. Selecionar “*Results*”. Os dados para o fluoróforo FAM estarão mostrados numa planilha. Selecionar a aba “*Amplification Data (RFU)*” da planilha;
- 5.3. Para retirar o ruído, selecionar a opção “*Background subtract*” no Analysis mode que fica no lado direito da tela;
- 5.4. Iniciar o programa “*Plexor Analysis*” clicando na pasta “*Plexor*” que se encontra no desktop do mesmo computador;
- 5.5. Clicar no aplicativo “*Analysis*”. O programa “*Plexor(R) Analysis*” abrirá. Os programas “*Plexor Analysis*” e “*iQ5 Bio-Rad*” deverão estar abertos ao mesmo tempo para a análise dos resultados.
- 5.6. No Menu principal, selecionar “*File> Import New Run*” ou clicar no ícone



. Uma nova janela se abrirá.

- 5.7. Selecionar o equipamento clicando sobre “*Biorad iQ5 (via paste)*” (Figura 1);
- 5.8. Se os fluoróforos não estiverem visíveis, clicar em “*add target*” quatro vezes. Preencher de acordo com a Figura 8, marcando “*Amplification*” e “*Melt*” para todos os fluoróforos, exceto para o IC5, que será a “*passive reference*”. Clicar em “*Next*”. A janela “*File Import*” se abrirá;

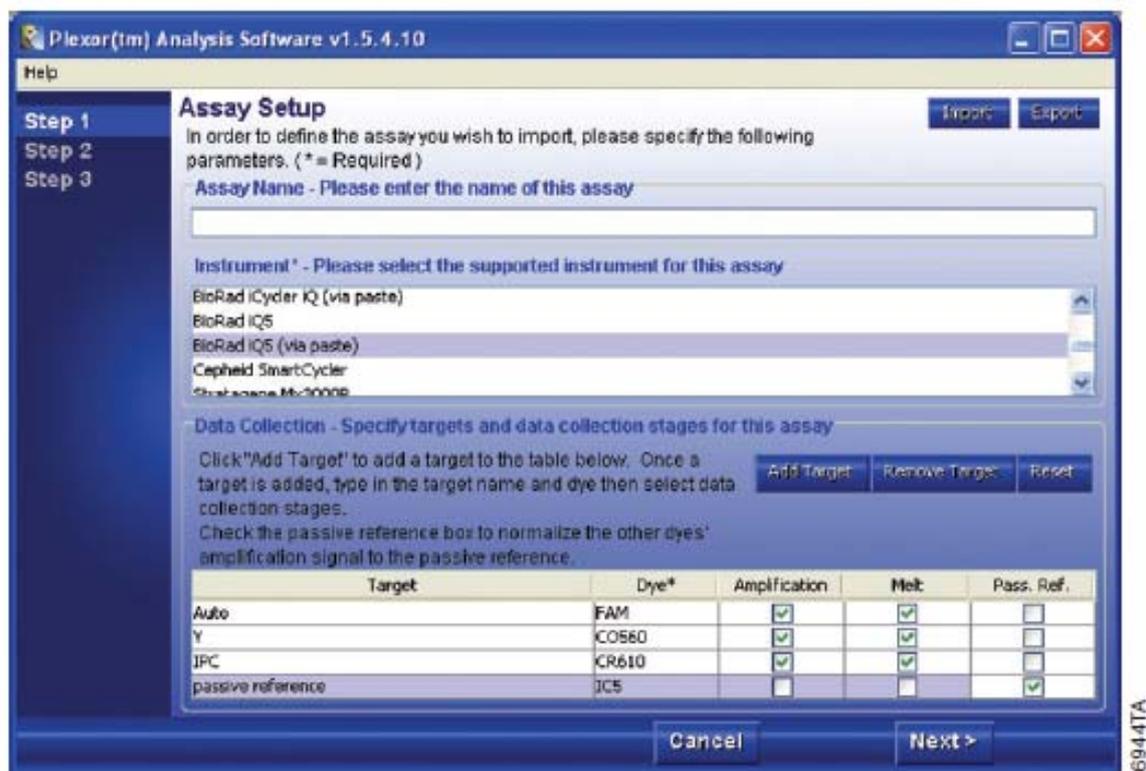


Figura 1. Importando os dados do programa *iQ5* para o programa *Plexor Analysis*.

5.9. Retornar para o programa *iQ5* na aba “PCR Quant” do módulo “Data Analysis”. Selecionar a aba “Amplification Data (RFU)” na planilha para o fluoróforo FAM. O fluoróforo FAM corresponde ao DNA autossômico, o CO560 ao cromossomo Y e o CR610 ao controle interno.

5.10. Selecionar todos os dados da planilha clicando no canto superior esquerdo da planilha e depois utilizar o atalho *Control + C* para copiar os dados (Figura 2 e 3);

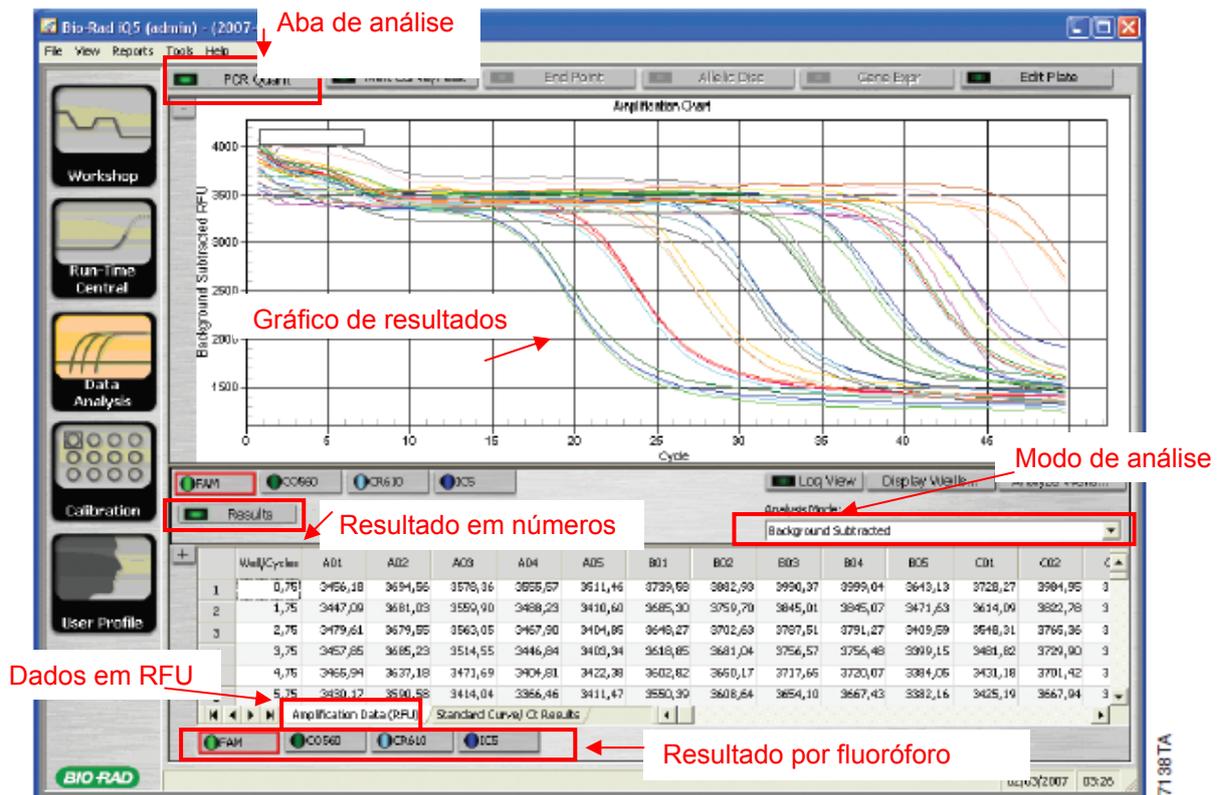


Figura 2. Resultados da quantificação no iQ5.

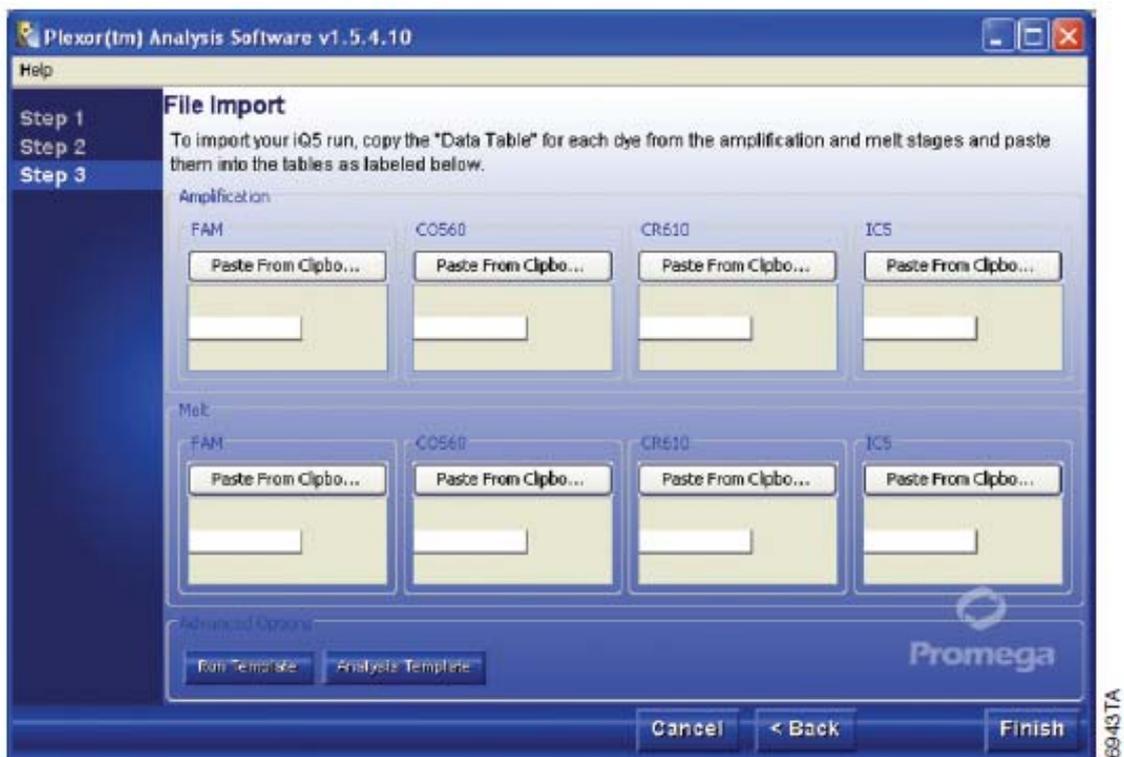


Figura 3. Janela do programa Plexor Analysis para importação dos dados.

5.11. Na janela “File Import” do programa “Plexor Analysis” clicar em “Paste from clipboard” para o fluoróforo FAM. Os dados da planilha serão copiados para o programa. Repita a operação para todos os fluoróforos, copiando os dados da aba PCR Quant”;

5.12. No programa iQ5, selecionar a aba “Melt curve/peak”. Selecionar a aba “-d(RFU)/dt”, localizado embaixo da tabela de resultados. Copiar os dados de todos os fluoróforos para o “Plexor Analysis” como foi feito anteriormente para os dados de amplificação (Control+C/ Paste from clipboard) (Figura 4).

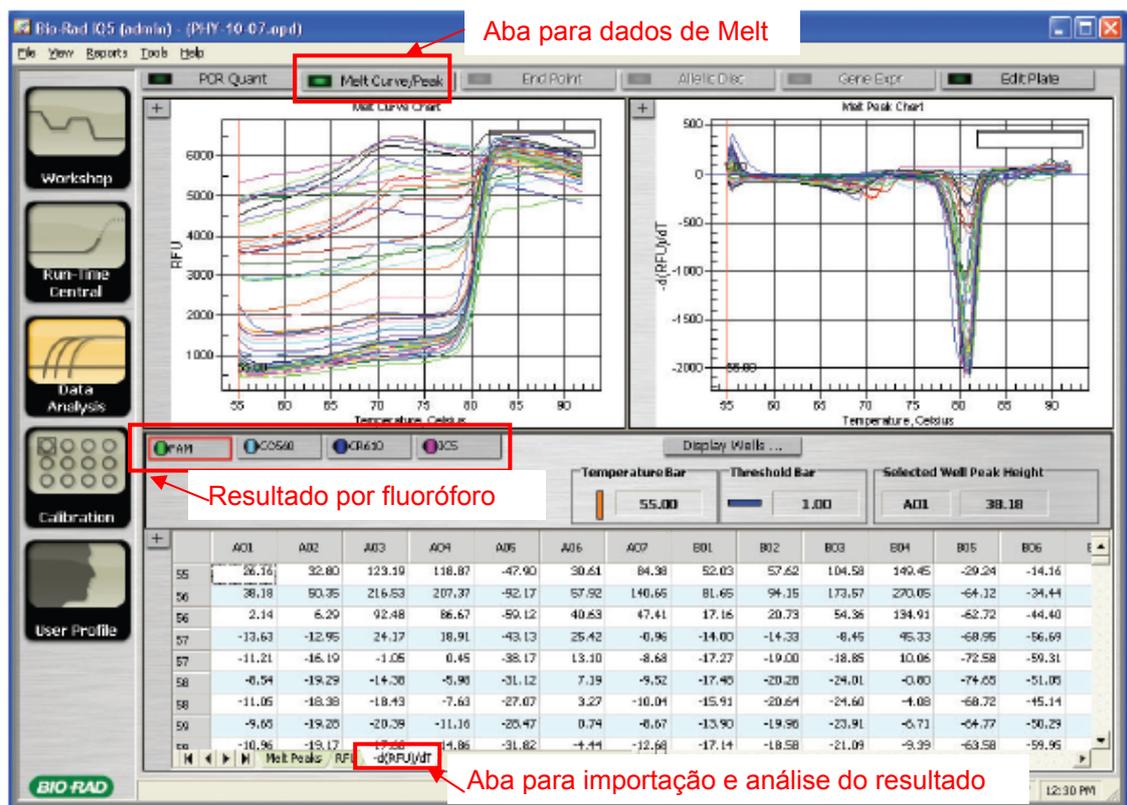


Figura 4. Resultados de temperatura de Melting.

5.13. Quando todos os dados tiverem sido copiados do “iQ5” para o “Plexor Analysis”, clicar em “Finish”.

5.14. Fechar o programa iQ5. A tela do termociclador passará da função “Host control mode” para a opção “Register user”;

5.15. Abrir o equipamento, levantando a alavanca e empurrando a tampa para trás;

5.16. Retirar a placa do equipamento;

5.17. Descartar a placa em lixo biológico;

- 5.18. Fechar novamente o equipamento;
- 5.19. Desligar o equipamento, desligando primeiramente a parte de cima (sistema de detecção) e depois a parte de baixo (termociclador);
- 5.20. Salvar os resultados da quantificação do programa “*Plexor Analysis*” (extensão do arquivo:.aan) para um pen-drive previamente formatado, utilizando o nome da placa correspondente.
- 5.21. Fechar o programa “*Plexor Analysis*”;
- 5.22. Desligar o computador.
- 5.23. Em um computador da sala de peritos, salvar o arquivo de resultados .ann em *compartilhada>Biologia e DNA>DNA>PCR em tempo real>Plexor>resultados*.
- 5.24. Abrir novamente o aplicativo “*Plexor Analysis*” em *compartilhada>Biologia e DNA>DNA>PCR em tempo real>Plexor>Analysis*.
- 5.25. No menu principal, selecionar *File>Abrir*. Escolha o arquivo desejado.
- 5.26. Utilizando os botões da Tabela 1, definir as amostras como padrões (“*Standards*”), desconhecidas (“*Unknown*”) ou controle negativo (“*non-template control-NTC*”). Selecionar os poços e depois clicar nos botões para definir as amostras;

Tabela 1. Botões e definições para análise no programa *Plexor Analysis*.

Botão	Definição
	Definir cor da amostra para visualização
	Definir amostra como desconhecida (para análise)
	Definir amostra como controle negativo – NTC



Definir amostra como padrão



Definir diluição seriada



Definir amostra como controle positivo



Criar curva padrão

5.27. Diferenciar as cores das amostras-padrão (verde), desconhecidas (azul) e



NTC (vermelho). Clicar em , selecionar a cor e depois, as amostras correspondentes.

5.28. Ajustar a temperatura de desnaturação (“*melting temperature*”) para os fluoróforos FAM, CO560 e CR610. Selecionar a aba “*PCR curves*” e depois selecione os poços que contém a curva padrão. Na janela “*Melt curves*” posicionar o cursor sobre a linha da temperatura de desnaturação esperada (“*expected target melt temperature line*”), clicar e arrastar o cursor até o centro da curva de desnaturação. A Tabela 2 mostra os valores de temperatura de melting – T_m – esperados para as curvas de desnaturação.

Tabela 2. Temperatura de desnaturação esperada para os fluoróforos FAM, CO560 e CR610.

Fluoróforo	FAM (Autossômico)	CO560 (Y)	CR610 (Controle interno)
T_m	79-81°C \pm 1,5	81-83°C \pm 1,5	79-81°C \pm 2



5.29. Selecionar as amostras-padrão, clicando em . A janela de diluição

seriada se abrirá (Figura 5).

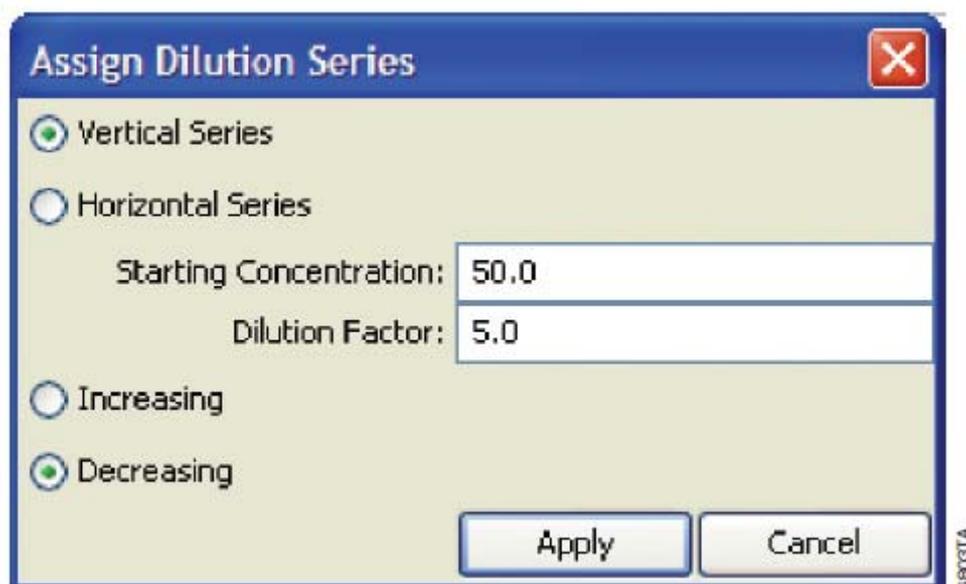


Figura 5. Janela de diluição seriada.

5.30. Na janela “Assign Dilution Series”, selecionar “Vertical Series”, “Starting Concentration: 50”, “Dilution Factor: 5” e “Decreasing”. Clicar em “Apply”.

5.31. Para criar uma curva padrão, selecionar a aba “Standard curves”. Selecionar as amostras padrão, a aba do fluoróforo FAM, e então clicar em

seguida o botão  “Add Standard curve”. A aba “Standard curve” habilitará.

5.32. Selecionar a aba “Standard curve”. Na janela aparecerá a curva padrão e o coeficiente de regressão linear. A curva deve ter algumas características como $R^2 > 0,98$ e *Slope* entre -3,1 e 3,7. O “Slope” ou inclinação da reta representa a eficiência de amplificação, sendo que uma inclinação de -3,3 representa uma eficiência de 100%, ou seja, a duplicação dos produtos de amplificação a cada ciclo.

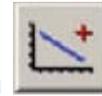
5.33. Um $R^2 < 0,98$ pode ser resultado de variação na diluição ou pipetagem (comumente, o último ponto da curva). Se o valor de R^2 não foi alcançado, podem ser removidos até dois pontos que se distanciam da curva, para uma maior precisão dos cálculos. Para remover um ponto, selecionar a amostra na planilha na aba “PCR Curves” e a tecla “delete” do teclado do computador.

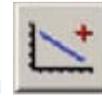
Selecionar as amostras-padrão para uma nova curva e clicar novamente



. Uma janela de confirmação irá aparecer. Clicar em OK. Para visualizar a nova curva, selecionar a aba “*Standard curves*”.

5.35. Selecionar a aba “*PCR curves*”, fluoróforo *FAM* (DNA autossômico),



selecionar todas as amostras da planilha e clicar novamente em . Uma janela de confirmação irá aparecer. Clicar em OK. Assim, todas as amostras serão quantificadas de acordo com as amostras-padrão na curva de regressão.

5.36. Repetir o procedimento do item anterior para os fluoróforos *CO560* (DNA masculino) e *CR610* (controle interno).

5.37. Selecionar a aba “*Sample IDs*”, uma planilha com o mapa das amostras aparecerá na tela.

5.38. Abrir o arquivo excel (*xls.*) correspondente a placa em questão no endereço *compartilhada > Biologia e DNA > PCR em tempo real > Placas*.

5.39. Copiar os nomes de cada amostra da planilha do excel para a planilha do programa “*Plexor Analysis*”, célula a célula .

5.40. Selecionar a aba *PCR curves*. Nesta aba, é feita a análise de amplificação (Figura 6).

5.41. Na parte superior esquerda, visualiza-se o gráfico com a curva de amplificação. Deve ser feita para todos os fluoróforos. Para visualizar cada amostra, clica-se na amostra da planilha. Várias amostras podem ser selecionadas ao mesmo tempo, desde que a tecla *control* do teclado se mantenha pressionada durante a seleção. Quanto mais à esquerda a curva exponencial da amostra, maior a quantidade de DNA. Ou seja, quando mais rápido a amostra entra na função exponencial de duplicação cortando o eixo horizontal de *Ct*, mais DNA tem na amostra.

5.42. No gráfico inferior, encontra-se a curva de melting. Esse gráfico serve apenas como controle de qualidade das amostras. Os picos das amostras devem estar todas na região azulada do gráfico. A temperatura de melting é humana específica.

5.43. No lado direito, aparece os resultados da quantificação como uma legenda dos gráficos.

5.44. Para verificar a presença de inibidores, selecionar cada amostra individualmente na aba FAM juntamente com uma amostra padrão de concentração semelhante. Em seguida, selecionar a aba CR610-IPC, verificar se amostras cortam o eixo de Ct em pontos semelhantes (mesmo momento de amplificação de DNA). Se cortarem em pontos semelhantes, significa que houve amplificação normal e ausência de inibidores. Se não houver corte da amostra analisada ou houver em ponto distante em até dois pontos, significa que não houve amplificação do DNA da amostra e a presença de inibidores. Amostras com a presença de inibidores necessitam ser novamente purificadas.

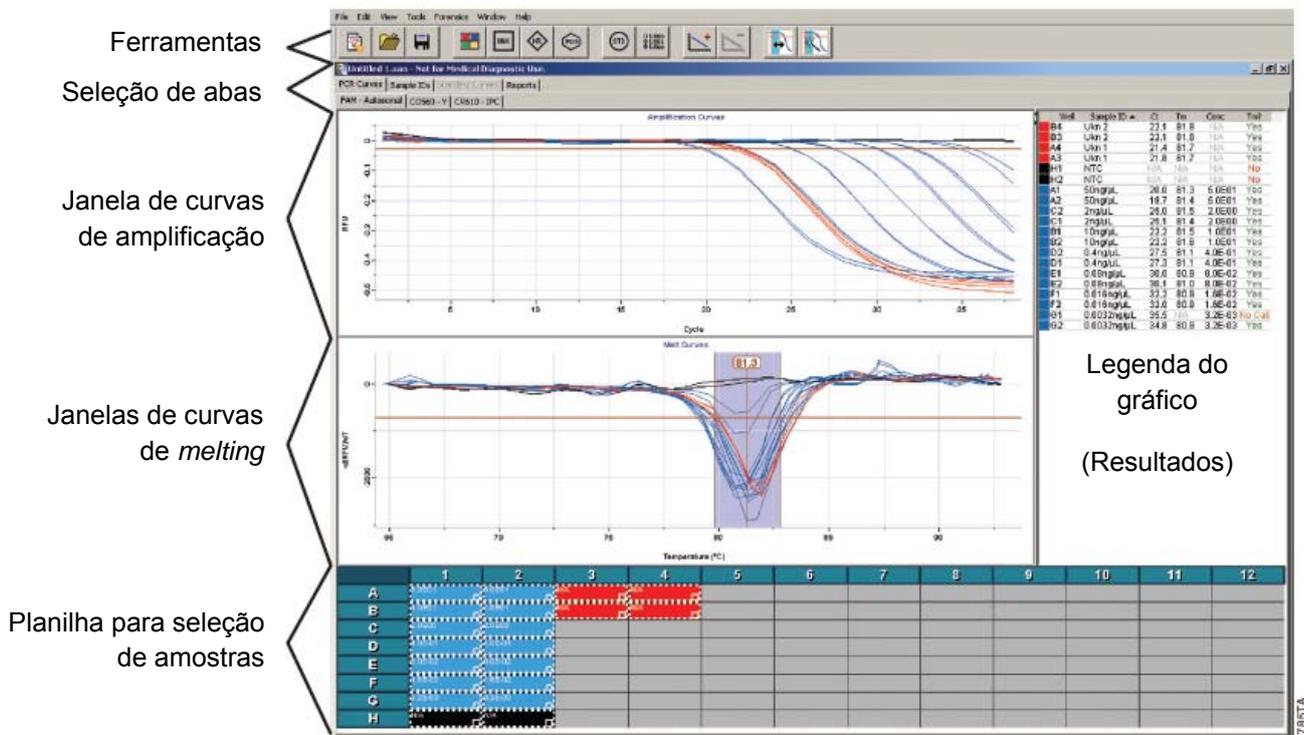


Figura 6. Tela de análise dos resultados da quantificação.

5.45. Para gerar um relatório contendo os resultados da quantificação, selecione "Forensics" no Menu e depois "Set STR normalization and IPC Parameters". Defina os valores para as variáveis de cada uma das funções: "Autosomal STR", "Y-STRs" e "IPC". Os valores de STR autossômico e STR Y são definições para planejar uma PCR (com definições do fabricante). O IPC é o valor de tolerância à presença de inibidores, utiliza-se o valor de 2,0. Clicar em "Apply".

5.46. Para imprimir os resultados, selecione as amostras de cada LD, e em



seguida no ícone . Selecionar a impressora correspondente e clicar em OK. As folhas devem ser arquivadas em cada pasta do caso.

6. Referências:

PROMEGA. Plexor[®] HY System for the Bio-Rad iQTM5 Real-Time PCR Detection System. Instructions for use of products DC1000 and DC1001. Technical Manual.

	Secretaria da Segurança Pública e Justiça Superintendência de Polícia Técnico-Científica Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues Laboratório de Biologia e DNA Forense	POP Nº ICLR.SEBIO.O.011
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO- POP quantificação de DNA utilizando o Kit Plexor HY (Promega) e o equipamento IQ5TM Real Time PCR detection system (Bio-Rad)	REVISÃO nº 0001 Página 79 de 110

1. Objetivos:

c. **Geral** : *sistematizar e padronizar a rotina de trabalho, contribuindo para a melhoria na qualidade dos processos, favorecendo a seleção adequada de recursos e ferramentas necessárias à execução do serviço, colaborando para aplicação das normas de segurança no ambiente de trabalho, facilitando o processo de capacitação profissional e a comunicação efetiva no local de trabalho.*

Específico: quantificar as amostras de DNA extraído total e masculino para orientação no procedimento de amplificação por PCR.

2. Campo de Aplicação:

Laboratório de DNA do Instituto de Criminalística Leonardo Rodrigues.

3. Definições, siglas e abreviaturas

- **DNA:** ácido desoxirribonucléico - composto orgânico que contém instruções genéticas
- **Microtubos:** tubos em polipropileno com tampa;
- **Vortex:** aparelho utilizado para a homogeneização e/ou agitação mecânica de amostras.
- **PCR:** reação em cadeia da polimerase.
- **µl:** microlitro.
- **ng:** nanograma.

4. Recursos necessários:

- Amostras de DNA extraído;
- Estante para microtubos
- Água ultra-pura;
- Kit plexor HY (PROMEGA);
- DNA masculino padrão 50ng/uL (acompanha o kit)
- Placa de 96 poços para PCR.
- Fita selante de qualidade ótica.
- Espátula para vedação.
- Pipetas e ponteiras diversas.
- Instrumento de PCR em tempo real (IQ5).
- Software Plexor® Analysis.

5. Procedimento:

5.1. Registrar a placa com o nome das amostras a serem utilizadas no procedimento, utilizando a planilha modelo salva em *Biologia e DNA>DNA>PCR em tempo real>PLACAS*;

5.2. Imprimir uma cópia;

5.3. Organizar as amostras de DNA extraído em estantes de modo a facilitar a sua localização correta no procedimento;

5.4. Retirar o DNA padrão e os demais reagentes do congelador até que estes atinjam a temperatura ambiente; Centrifugar por 3-5 segundos utilizando vortex;

5.5. Preparar, na sala de Pré-PCR, o mix de PCR com os reagentes descritos na planilha (Plexor®HY 2X Master mix, Plexor®HY 20X Primer / IPC e água ultra-pura) de acordo com a quantidade de amostras (Tabela 1). Centrifugar por 3-5 segundos utilizando vortex;

Tabela 01. Preparo da reação de PCR para quantificação (para 2uL de DNA/ reação).

Componente	Volume (por reação)
Plexor® HY 2X Master Mix	10uL
Plexor® HY 20X Primer/ IPC Mix	1uL
Água ultrapure	7uL
Volume final	18uL

5.6. Pipetar 18uL de mix em cada poço que será utilizado na placa de PCR. É importante seguir um único padrão de pipetagem e um único pipetador;

5.7. Preparar, na sala de extração, a diluição seriada do DNA padrão na proporção 1:5 em microtubos de 0,2uL, utilizando sempre a mesma água, e dispensar o DNA somente na parede do microtubo, tomando o cuidado de não afundar a ponteira no líquido. Centrifugar por 3-5 segundos utilizando vortex antes de remover a alíquota para cada nova diluição (Tabela 2);

Tabela 2. Diluições para a DNA padrão.

Concentração	Volume de DNA	Volume de água
50ng/uL	Use o DNA não diluído	0uL
10ng/uL	10uL do DNA não diluído	40uL
2ng/uL	10uL da diluição 10ng/uL	40uL
0,4ng/uL	10uL da diluição 2ng/uL	40uL
0,08ng/uL	10uL da diluição 0,4ng/uL	40uL
0,016ng/uL	10uL da diluição 0,08ng/uL	40uL
0,0032ng/uL	10uL da diluição 0,016ng/uL	40uL

5.8. Pipetar em duplicata, para as amostras-padrão, 2uL de cada diluição nas colunas “1” e “2” da placa de acordo com a figura abaixo (Figura 1). É importante seguir um único padrão de pipetagem e um único pipetador;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50 ng/uL	50 ng/uL	UNK	UNK	UNK							
B	10 ng/uL	10 ng/uL	UNK	UNK	UNK							
C	2 ng/uL	2 ng/uL	UNK	UNK	UNK							
D	0,4 ng/uL	0,4 g/uL	UNK	UNK	UNK							
E	0,08 ng/uL	0,08ng/uL	UNK	UNK	UNK							
F	0,016 ng/uL	0,016ng/uL	UNK	UNK	UNK							
G	0,0032ng/uL	0,0032ng/uL	UNK	UNK	UNK							
H	NTC	NTC	UNK	UNK	UNK							

Figura 1. Esquema da placa com as amostras e padrões.

- 5.9. Pipetar água ultra-pura nos poços H1 e H2 2uL;
- 5.10. Pipetar 2uL das amostras de DNA correspondentes da planilha, nos poços da coluna 3 a 12. É importante seguir um único padrão de pipetagem e um único pipetador;
- 5.11. Vedar a placa com o selante, tomando o cuidado de segurá-lo apenas pelas laterais. A placa não pode encostar o fundo em lugar algum;
- 5.12. Fixar o selante com a espátula com o objetivo de vedar todos os poços e evitar a evaporação de líquido durante a PCR;
- 5.13. Retirar as laterais do selante;
- 5.14. Centrifugar rapidamente a placa para garantir a inexistência de bolhas e para que o líquido esteja no fundo do poço. As bolhas que se encontram na parte superior do líquido sairão quando a placa for aquecida, mas as bolhas que se encontram no fundo dos poços devem ser retiradas por centrifugação;
- 5.15. Ligar o termociclador (*iCycler*) e a parte de cima do equipamento, onde se encontra o sistema de detecção das fluorescências. Os botões Liga/Desliga encontram-se na lateral do equipamento;
- 5.16. Ligar o computador dedicado ao equipamento;
- 5.17. Abrir a parte superior do equipamento levantando a alavanca da tampa do termociclador e empurrando-a para trás do equipamento;
- 5.18. Colocar a placa já selada no equipamento. Verifique se o selo encontra-se bem colocado;
- 5.19. Fechar a tampa do equipamento;
- 5.20. Iniciar o programa Bio-Rad *IQ5* clicando na tecla de atalho que situa-se no desktop. Na tela do termociclador, a opção “*Register user*” que se encontrava piscando passará para a função “*Host control mode*”;
- 5.21. Selecionar, no módulo “*Workshop*”, “*protocol*” e depois o programa “*PlexorHY*” (Figura 2);

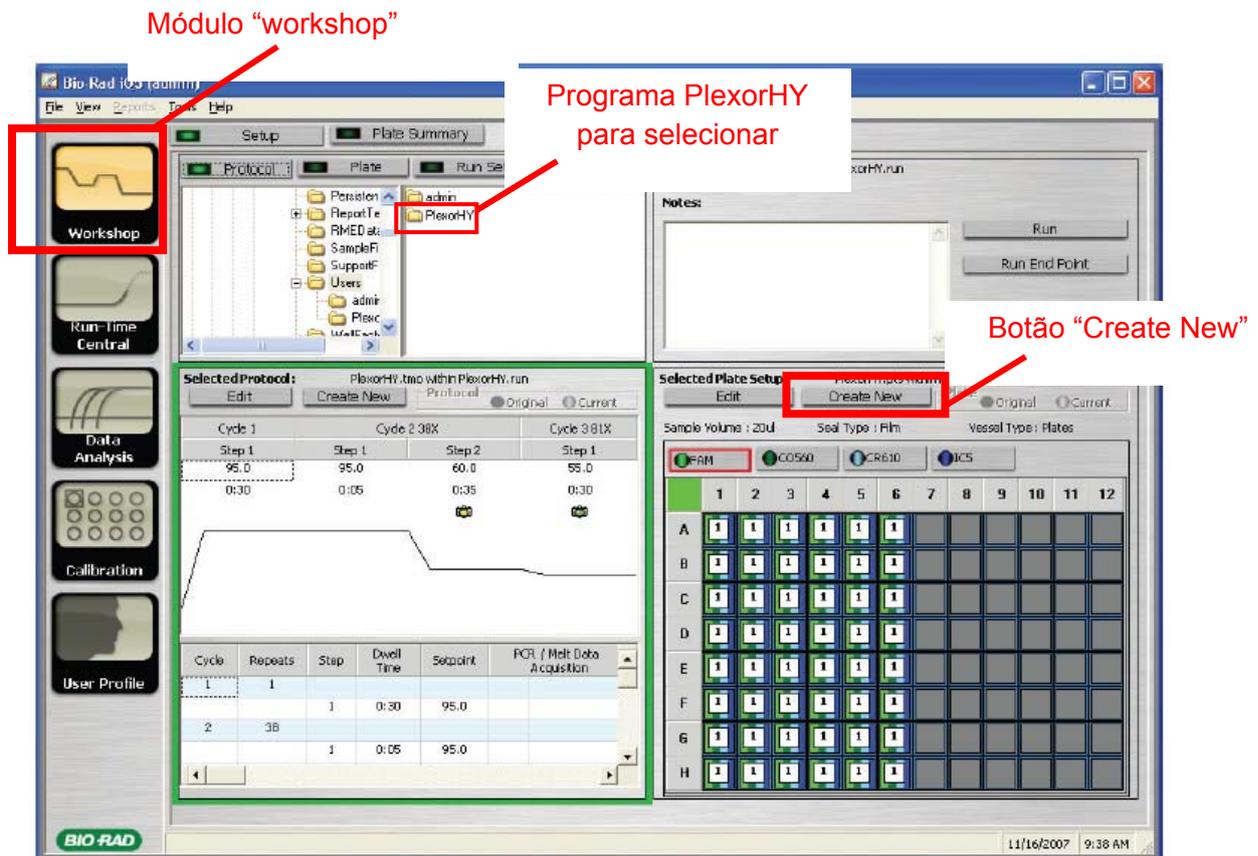


Figura 2. Tela inicial do programa Bio-rad IQ5.

5.22. Criar uma nova placa clicando no botão “*Create New*”, que fica no lado direito em “*Select Plate Setup*”>*Create new* (Figura 1). A janela “*Plate septup editor*” abrirá;

5.23. Selecionar, na placa virtual que aparece na tela, os poços que serão utilizados e identificar se são amostras, padrões ou controle negativo (*unknown, standard ou NTC*) utilizando os botões de funções. Para selecionar, clique no botão xxx e em seguida no botão correspondente ao tipo de amostra (Tabela 3). No caso das amostras padrões, as replicatas devem ter o mesmo número. Os poços de mesma numeração e função serão considerados replicatas pelo algoritmo;

5.24. Selecionar a opção *Select/ Add fluorophores*. Para o protocolo *Plexor*, selecione FAM, CR610, CO560 e IC5. Clicar em OK (Figura 3);

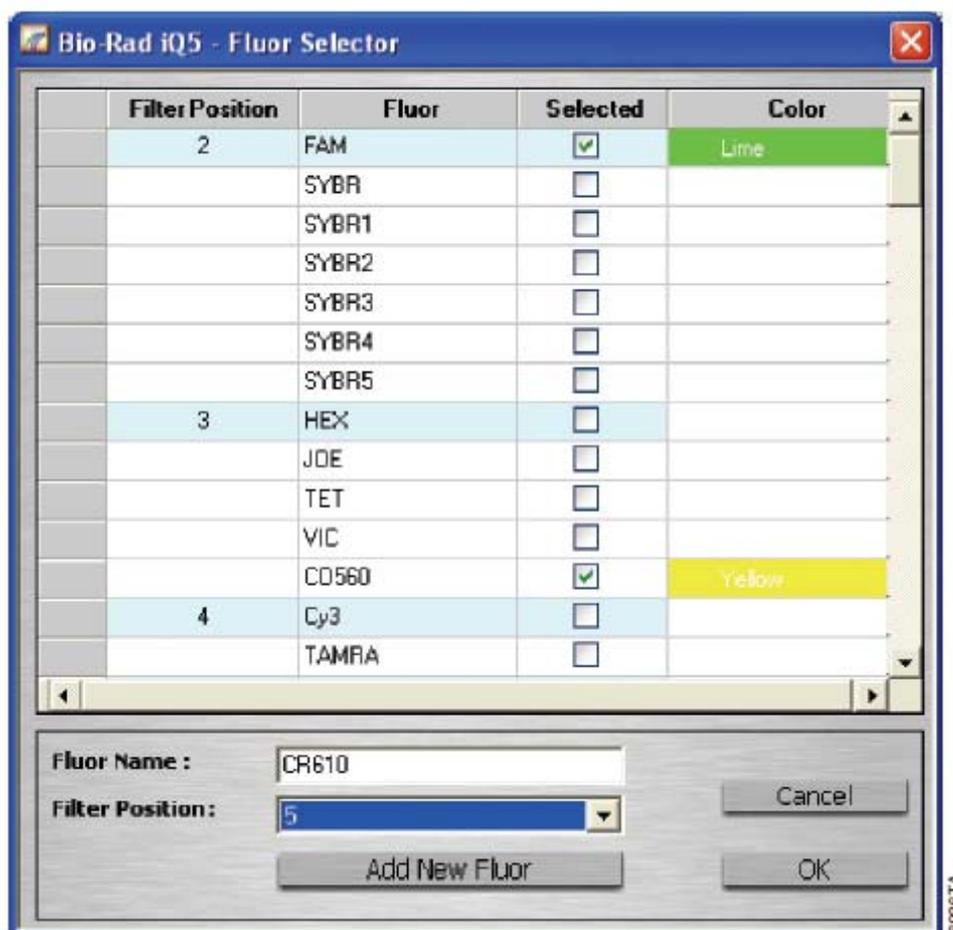


Figura 3. Selecionando os fluoróforos.

5.25. Clicar sobre o fluoróforo no lado direito da tela e depois sobre o botão



, para que o sistema de detecção faça a leitura dos fluoróforos selecionados. Selecionar os poços ou clicar no canto superior esquerdo da placa virtual. A cor correspondente a cada um dos fluoróforos deve aparecer em cada um dos poços utilizados durante a quantificação (Tabela 3 e Figura 4);

Tabela 3. Botões utilizados para definir as configurações dos poços da placa.

Botões	Definição
--------	-----------



	Botão usado para a seleção dos poços
--	--------------------------------------



Amostra com concentração desconhecida



Amostra de DNA padrão



Controle negativo



Botão usado para definir os fluoróforos que serão detectados durante o experimento nos poços selecionados



Remove o fluoróforo do poço ou da placa



Remove todas as informações do poço

Identificação da numeração dos poços

seleção dos fluoróforos

diluição

Figura 5. Criando uma nova placa.

- 5.26. Selecionar *nanograms*, no canto direito da tela, na seção *units*. Logo abaixo selecionar *Dilution series* e depois indicar para o programa os poços da curva padrão (*replicates 1 a 7*);
- 5.27. Colocar 50, na opção "*Starting concentration*". Na opção "*dilution factor*" colocar 5. Selecionar "*decreasing*" e depois "*Apply dilution series*" para que o algoritmo calcule as concentrações de DNA da curva padrão;
- 5.28. Selecionar a opção "*Spreadsheet*" para verificar as configurações no formato de planilha;
- 5.29. Selecionar "*Exit Plate Spreadsheet Editing*" para voltar para a tela anterior, se as configurações estiverem corretas;
- 5.30. Selecionar "*Save & Exit Plate Editing*". Nomear a placa (ex.: 2011_Placa01);
- 5.31. Selecionar "*Run*";
- 5.32. Selecionar "*Collect well factors from experimental plate*" (Figura 6);

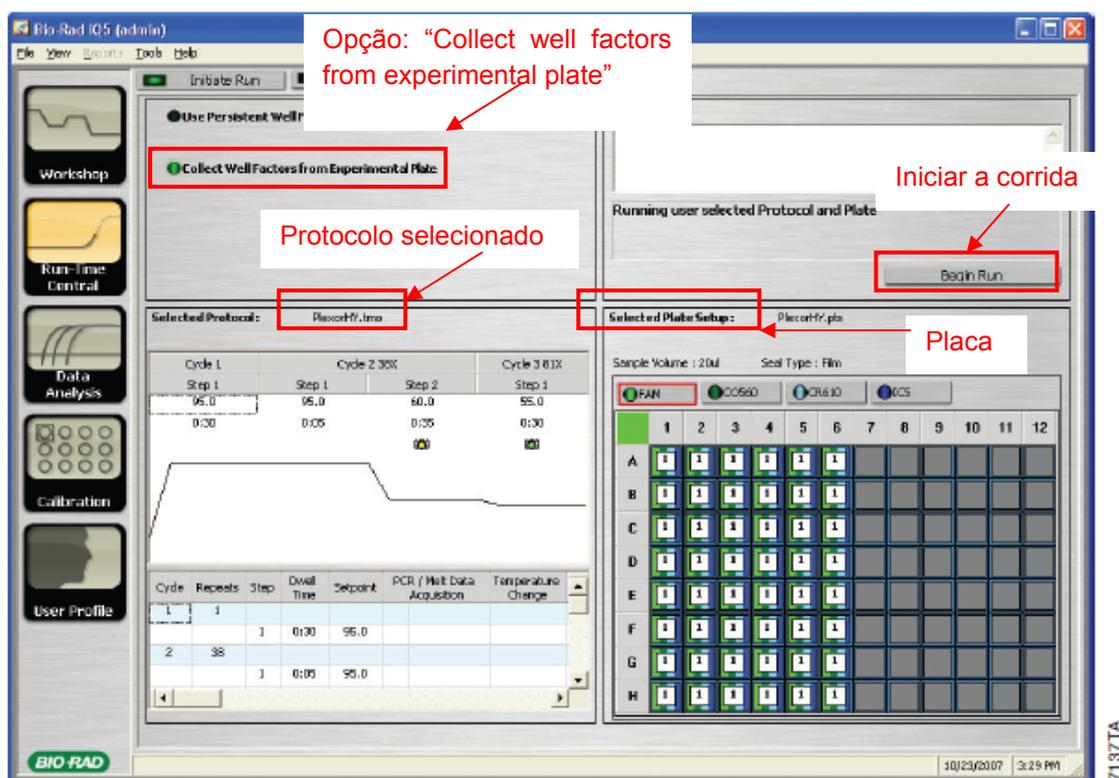


Figura 6. Iniciando a corrida.

- 5.33. Selecionar “*Begin Run*” (o sistema de detecção demora 15 minutos para aquecer, se aparecer a janela de alerta, aguardar o tempo solicitado e clicar novamente em “*Begin Run*”). Na tela aparecerá a informação “*Background readings data...*”, selecione “Yes”. Uma nova informação aparecerá “*Well Factor data has exceeded expiration time...*”. Selecione “Yes”;
- 5.34. Na tela aparecerá a janela “*Monitor Run*”, mostrando o andamento da quantificação;
- 5.35. Na tela do computador aparecerá o tempo de duração do experimento e o horário de término, assim como as etapas em andamento;
- 5.36. Selecionar “Yes” (Figura 7), após o término do experimento (aparecerá na tela do computador uma janela com a opção “*Display completed run in data analysis?*”) Fazer a análise dos resultados.

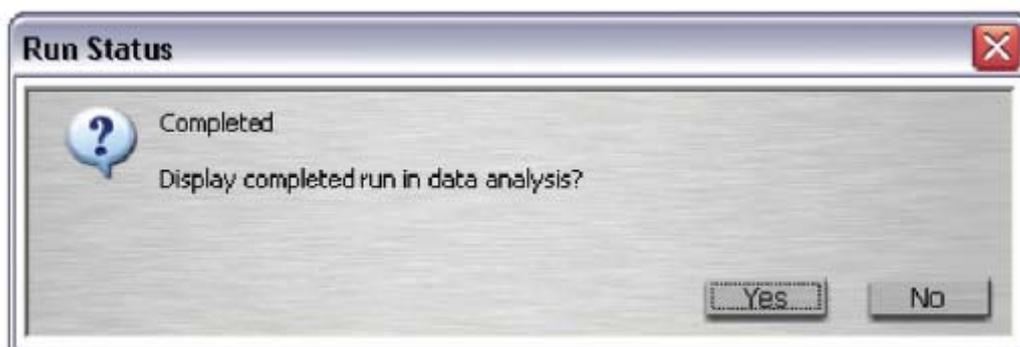


Figura 7. Janela indicando o fim da corrida.

7. Referência:

PROMEGA. Plexor[®] HY System for the Bio-Rad iQ[™]5 Real-Time PCR Detection System. Instructions for use of products DC1000 and DC1001. Technical Manual.

	<p>POP</p>	<p>Protocolo do Kit AmpF_STR® NGMTM PCR Amplification</p>
-----------------------------------------------------------------------------------	------------	-------------------------------------------------------------------

ANEXO IV. PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO

1. OBJETIVO: Estabelecer procedimentos para amplificação por PCR em multiplex de 15 marcadores STRs mais o determinador de gênero amelogenina utilizando o kit AmpF_STR® NGM™ PCR Amplification (P/N 4415020 - 200 reações, P/N 4415021 - 1000 reações) da Applied Biosystems.

2. RESPONSÁVEIS: Todos os coordenadores, colaboradores, estagiários e alunos do Centro de Treinamento Applied Biosystems (CTAB).

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES :

I) Componentes do kit

O kit AmpF_STR® NGM™ é composto por:

REAGENTE	CONTEÚDO	Quantidade 200 reações	Quantidade 1.000 reações
AmpFISTR® NGM SElect™ Primer Set	Primers forward e reverse para amplificar DNA humano	1 tubo, 1.0 mL	1 frasco, 5.0 mL
AmpFISTR® NGM SElect™ Master Mix	Tubos de Master Mix contendo enzima, sais, dNTPs, proteína carreadora, e 0,05% de azida sódica	2 tubos, 1.0 mL each	1 frasco, 10.0 mL
AmpFISTR® NGM SElect™ Allelic Ladder	Escada alélica contendo alelos amplificados	1 tubo, 50.0 µL	1 tubo, 75.0 µL

AmpFISTR® Control DNA 007	0,10 ng/uL de DNA humano masculino 007 em 0,02% de azida sódica e tampão	1 tubo, 0.3 mL	1 tubo, 0.3 mL
------------------------------	--------------------------------------------------------------------------	----------------	----------------

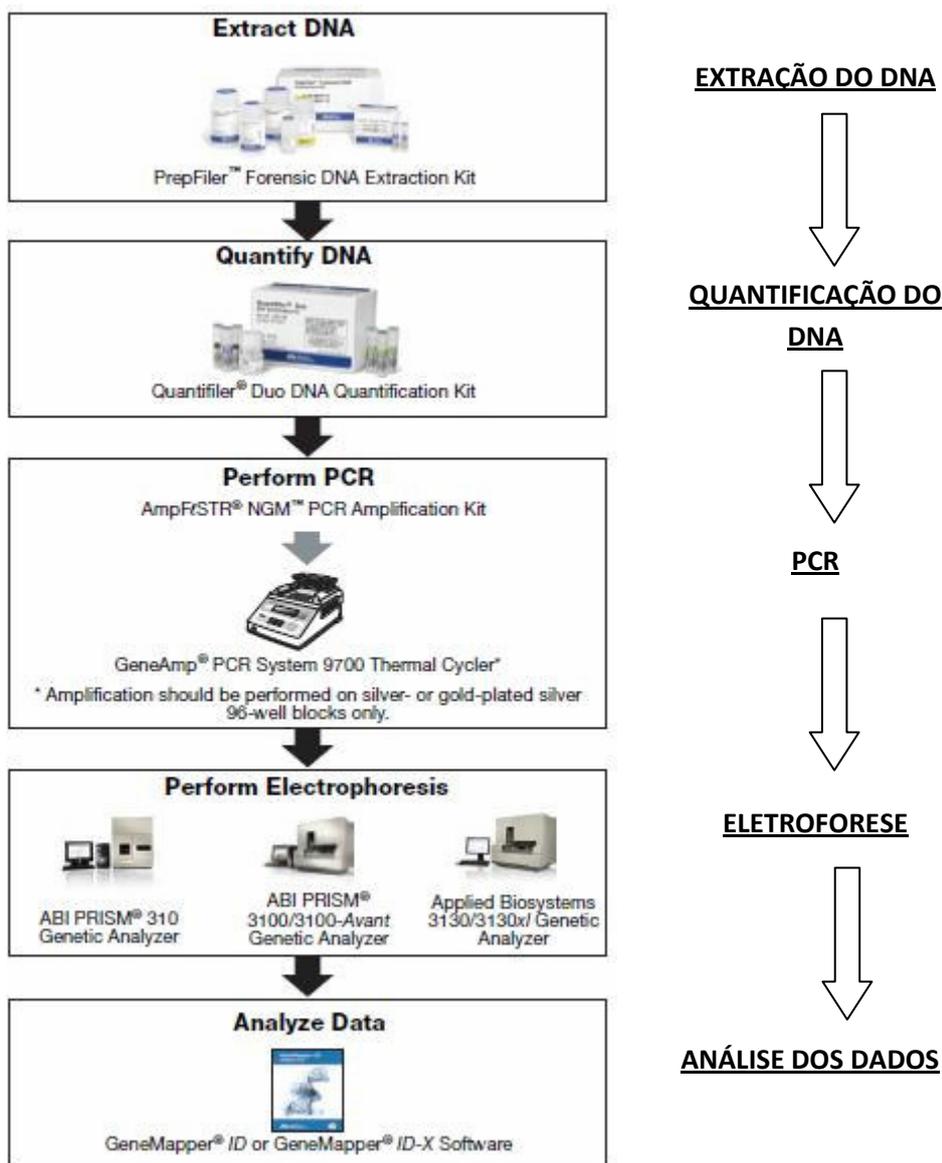
II) Armazenamento

A tabela abaixo lista a temperatura de armazenamento para os componentes do kit:

IMPORTANTE: Os fluoróforos anexados aos primers são sensíveis à luz. Proteja o tubo com AmpF_STR® NGM Primer Set da luz quando este não estiver em uso. DNA amplificado, AmpF_STR® NGM™ Allelic Ladder, e GeneScan™-500 LIZ Size Standard também devem ser protegidos da luz.

Componente	Temperatura
AmpF_STR® NGM Master Mix	-15 a - 25°C ao receber, 2 a 8°C após uso inicial
AmpF_STR® NGM Primer Set	
AmpF_STR® NGM™ Allelic Ladder	
AmpF_STR® Control DNA	2 a 8°C

Fluxograma de trabalho:



Preparo das Amostras

É importante que o DNA extraído esteja em quantidade suficiente para amplificação conforme recomendado pelo manual do usuário do kit. Para tanto deve ser escolhido protocolo de extração que garanta este rendimento. A amplificação por PCR com o kit AmpF_STR® NGM™ requer 5 µL de DNA à concentração recomendada de 0,05ng/ µL. Se for necessário normalização deve ser utilizado Low TE buffer*.

* **Low TE buffer** (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0). Você pode preparar o buffer como descrito abaixo ou comprar da Teknova (Cat # T0223).

Como preparar o low TE buffer:

1. Misturar:
 - 10 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 com
 - 0,2 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0 em

- 990 mL de água destilada ou deionizada.
- 2. Aliquotar e autoclavar a solução.
- 3. Estocar a temperatura ambiente

Nota: o volume final em cada tubo de PCR é de 12,5 µL.

III) Preparo dos Mixes para PCR

1- Calcular o volume de cada componente do KIT , de acordo com o número de amostras:

REAGENTE	VOLUME POR REAÇÃO
AmpF_STR® NGM™ Master Mix	5 µL
AmpF_STR® NGM™ Primer Set 2,5 µL	25 µL

Inclua uma reação adicional no cálculo para fornecer um excesso de volume para perdas que ocorra durante as transferências de reagentes.

2- Vortex os tubos com os reagentes e centrifugue, antes de pipetar o Mix.

3- Pipete os volumes do Mix em um tubo de tamanho apropriado.

4- Vortexe o mix e centrifugue.

5- Dispense 7,5 µL do Mix por poço da placa ou por tubo de reação.

6- Pipete as amostras de acordo com a tabela abaixo:

Amostra de DNA	Volume
Controle negativo	Adicionar 5 µL de low TE
Sua amostra	Diluir a amostra de maneira a obter 0,05 ng/µL.
Controle positivo	Combinar 5 µL do DNA controle 007 (0,1ng/µL) no Mix da reação para ter 0,5ng do DNA total na reação do controle positivo.

IV) Preparo da reação de PCR

Programar o termociclador com as seguintes condições:

Incubação inicial	Ciclagem (29 ciclos)		Extensão Final	HOLD FINAL
	desnaturação	anelamento		
HOLD	ciclagem		HOLD	HOLD
95°C 11min	94°C 20seg	59°C 3min	60°C 10min	4°C ∞

Importante: Se usar o GeneAmp PCR System 9700, selecionar o modo 9600 Emulation.

Quando a corrida estiver concluída, armazene o DNA amplificado, segundo as condições abaixo, protegendo-o da luz:

Tempo de armazenamento	Condições
Menos que 2 semanas	2 a 8° C
Mais que 2 semanas	-15 a -25° C

Observação: Os cartões de coleta tratados FTA® podem ser usados para coleta, armazenamento, e processamento de amostras biológicas. Um pequeno pedaço (punch) do cartão contendo mancha de sangue, retirado com auxílio de perfuradores específicos, pode ser colocado diretamente no tubo de amplificação, purificado, e amplificado sem haver transferência da evidência. Nossos estudos tem indicado que um pedaço do cartão de 1,2 mm contendo mancha de sangue contém aproximadamente 5 a 20 ng de DNA. De acordo com esta quantificação, o número apropriado de ciclos para esta grande quantidade de DNA é de 24 ciclos. No entanto, é recomendado que cada laboratório determine o número ciclos ótimo com base em estudos de validação interna.

V) VI) Preparo dos produtos de PCR para separação através de eletroforese capilar

1. Reagentes Necessários

Formamida Hi-Di™ (Aliquotar em tubos de 1,5 mL e armazenar em -15 a -25°C)

Genescan™ 500 Liz™ Size Standard (Armazenar em 2 a 8°C)

AmpF_STR® NGM™ Allelic Ladder (Armazenar em 2 a 8°C, após a primeira utilização)

2. Preparo da mistura de Formamida HiDi e Size Standard

1. Homogeneizar os reagentes acima com vortex e centrifugar rapidamente.

2. Preparar a mistura Formamida/Liz seguindo a especificação abaixo:

- (N_o de amostras + 2) x 8,7 µl de Formamida Hi-Di™
- (N_o de amostras + 2) x 0,3 µl de Liz 500 Size Standard

3. Distribuir 9 µL da mistura de Formamida/Liz em cada poço da placa.

4. Misturar o produto de PCR e adicionar 1 µl do produto em cada poço usando a micropipeta para misturar o produto de PCR com o Formamida/Liz. Para a amostra da escada alélica, adicionar 1 µL da escada alélica na mistura de Formamida/Liz.

5. Desnaturar as amostras a 95°C por 3 min.

6. Colocar no gelo por 3 min.

VI) Preparo do equipamento ABI PRISM 3130 para separação dos fragmentos de DNA

Módulo de corrida: **HIDFragmentAnalysis36_POP4_1**

Condição da Injeção: – **3100-Avant e 3130 = 3 kV/5 sec**
– **3100 e 3130xl = 3 kV/10 sec**

Dye Set: **G5**

VII) Análise dos resultados utilizando o software GeneMapper ID v3.2

Análise dos resultados obtidos com os kits AmpF_STR® através dos softwares validados para identificação humana: GeneMapper ID v3.2 ou GeneMapper ID-X.

4. REFERÊNCIAS : Manual do usuário do kit AmpF_STR® NGM™ PCR Amplification (P/N 4425511 Rev. B 11/2009)

ANEXO V.

TABELA 10. loci e alelos do Kit AmpFISTR® NGM Select™

Locus	Localização/ cromossomo	ALELOS	Marcador	DNA Controle
		Escada Alélica		007
D10S1248	10q26.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	6-FAM™	12, 15
vWA	12p13.31	11,12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	6-FAM™	14, 16
D16S539	16q24.1	5, 8, 9, 10, 11, 12,13, 14, 15	6-FAM™	9, 10
D2S1338	2q35	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	6-FAM™	20, 23
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	X, Y	VIC®	X, Y
D8S1179	8q24.13	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®	12, 13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38	VIC®	28, 31
D18S51	18q21.33	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	VIC®	12, 15
D22S105	22q12.3	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	NED™	11, 16
D19S433	19q12	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2	NED™	14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3	NED™	7, 9.3
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2	NED™	24, 26
D2S441	2p14	9, 10, 11, 11.3, 12, 13, 14, 15, 16	PET®	14, 15
D3S1358	3p21.31	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	PET®	15, 16
D1S1656	1q42.2	9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.3, 18.3, 19.3, 20.3	PET®	13, 16
D12S391	12p13.2	14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	PET®	18, 19
SE33	6	4.2, 6.3, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20.2, 21, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.230.2,31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35, 35.2, 36, 37	PET®	17, 25.2

ANEXO VI

3.1 PCR quantitativo em tempo real (real-time PCR)

O século XX foi marcado por diversas descobertas científicas. Contudo a descoberta da molécula de DNA, nomeadamente a sua estrutura e a sua função, terá sido uma das maiores revoluções no domínio da Biologia, visto ter possibilitado a compreensão dos mecanismos fundamentais da vida. Tal fato aumentou a vontade de conhecer e compreender o genoma, estando já completamente seqüenciados os genomas de diversas espécies, incluindo o do Ser Humano. O estudo do genoma possibilitou e, ainda possibilita, a análise, discussão e compreensão dos fenômenos da hereditariedade, da variabilidade inter e intra-específica, da erradicação e/ou controlo de doenças, entre outros aspectos (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

O aumento gradual do conhecimento da complexidade da molécula de DNA e a constante exigência de meios diagnósticos cada vez mais rápidos e específicos, conduziram ao desenvolvimento de diversas técnicas de quantificação do DNA ao longo dos últimos 50 anos. Destacam-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as numerosas variantes recentemente desenvolvidas, entre as quais se evidencia a PCR em tempo real que tem como principal particularidade a monitorização em tempo real da amplificação (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Devido à rapidez, sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade da técnica, a PCR em tempo real é hoje em dia fundamental em investigação médica, forense ou biotecnológica. As suas aplicações estendem-se desde a genotipagem e a quantificação da expressão génica até à toxicologia forense e à biossegurança. Esta amplitude de aplicações é demonstrada pelo crescimento quase exponencial das publicações científicas baseadas nesta técnica desde a sua criação em 1993 (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008; Oliveira, 2009).

3.1.1 Contextualização histórica

O sucesso da amplificação de DNA pela técnica da PCR convencional está dependente de diversos fatores, como a presença de inibidores, a quantidade de DNA, o estado de degradação do DNA, entre outros. Assim, a necessidade de monitorizar em simultâneo a quantidade e qualidade do DNA amplificado levou ao desenvolvimento de uma variante da técnica da PCR convencional: a PCR em tempo real.

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa ou simplesmente qPCR ou RTQ-PCR, foi descrita pela primeira vez em 1993, por Higuchi e seus colaboradores. Montaram um sistema ao qual acoplaram uma câmara de vídeo, de modo a monitorizar a PCR durante todos os ciclos. Este mecanismo permitia-lhes detectar o aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas (Higuchi *et al.*, 1993).

O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação. Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real (Heid *et al.*, 1996). O sucesso da técnica rapidamente levou ao seu aperfeiçoamento. Para tal contribuíram, por exemplo, o desenvolvimento de sondas de oligonucleótidos de dupla-hélice e a descoberta de que a *Taq* polimerase possui atividade exonuclease 5'→3'. Na última década diversas plataformas de instrumentação foram criadas e comercializadas, no entanto, a maioria é composta por um termociclador, com sistema óptico para a excitação e recolha da emissão da fluorescência e um computador com *software* próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (Mackay *et al.*, 2007).

3.1.2 Princípios da técnica

O procedimento da técnica de PCR em tempo real segue o princípio geral da PCR convencional. Assim, apresenta as três fases características da PCR: a fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. A primeira fase é bastante específica e precisa. Ao final da fase de crescimento linear os produtos da reação são consumidos iniciando o processo de degradação. A fase estacionária corresponde ao final da análise devido ao elevado nível de degradação dos produtos da PCR. Os compostos fluorescentes adicionados ao DNA geram um sinal de fluorescência que é diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases e que podem ser representados graficamente como demonstrado na Figura 3 (Chen e Janes, 2002).

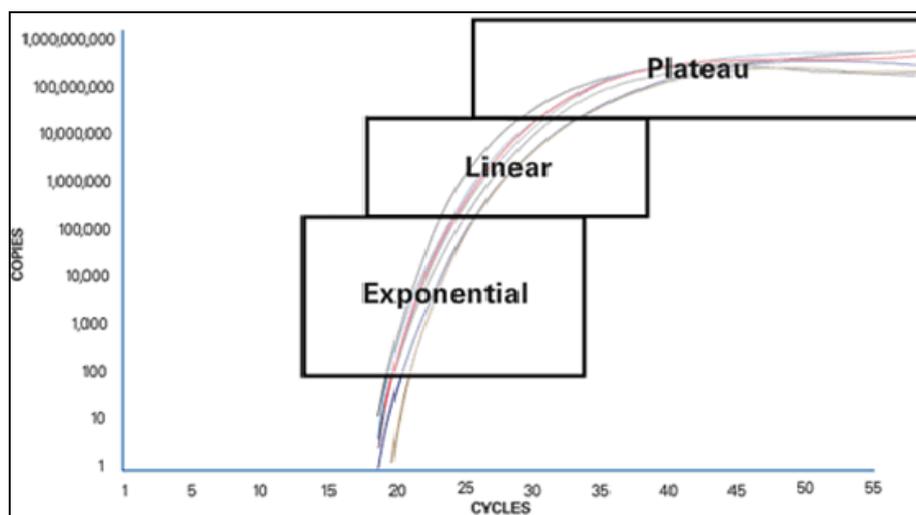


Figura 3 – Representação gráfica das fases da PCR em tempo real.

(Adaptado de Kubista *et al.*, 2006).

A fase de crescimento exponencial é considerada a melhor para se estudar a reação devido à elevada eficiência registada, uma vez que a relação entre a quantidade de produto e do *input* de DNA é mais consistente. Por este motivo os dados de fluorescência são geralmente recolhidos desde o início do processo de amplificação (Zaczek *et al.*, 2010)

A interpretação dos resultados obtidos pelos equipamentos obriga a que se definam conceitos específicos, como *baseline*, ponto CT e *threshold*. A *baseline* corresponde ao limiar mínimo de detecção de fluorescência do instrumento sendo considerado “ruído de fundo” do equipamento. O ponto CT, denominado na literatura como *cycle threshold*, corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável. Trata-se de um ponto a partir do qual a fluorescência detectada ultrapassa o limiar da fase exponencial, conhecido também na literatura como *threshold*, definido automática e arbitrariamente pelo *software* do equipamento em função da *baseline* (Pieńkowski *et al.* 2010; Blackshaw *et al.* 2010).

O valor mínimo de CT é dependente da quantidade de moléculas presente no início do processo de amplificação, o que significa que um menor número de moléculas inicialmente representa um maior número de ciclos requeridos para gerar um aumento exponencial do sinal da fluorescência que seja significativamente superior à *baseline* (Heid *et al.*, 1996; Kubista *et al.*, 2006; Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Na maioria dos protocolos da PCR em tempo real, o valor CT varia entre 17 ciclos (aproximadamente 10 milhões de moléculas iniciais) e 37 ciclos (aproximadamente 1 molécula inicial) como é demonstrado na Figura 4 (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

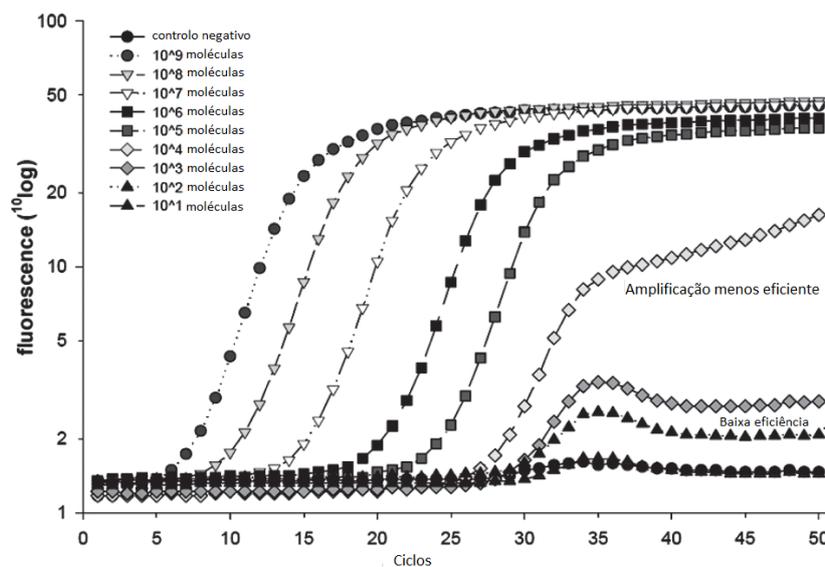


Figura 4 – Representação gráfica dos resultados da amplificação em tempo real em função de diferentes teores de moléculas de DNA iniciais (Adaptado de Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A eficiência (E) da amplificação é fundamental para o sucesso da técnica. Esta deve variar idealmente entre os 90% e 100% ($-3.6 > \text{declive} > -3.1$), podendo ser determinada através de métodos diversos. O mais simples baseia-se na equação: $E = 10^{(-1/\text{declive})-1}$ (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A eficiência da amplificação pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo o comprimento do amplicom, existência de estruturas secundárias na amostra, qualidade dos *primers* usados, procedimentos laboratoriais incorretos, presença ou utilização de inibidores da PCR (hemoglobina, ureia, heparina, glicogénio, gorduras, íons cálcio, etc.), presença ou utilização de promotores da PCR (glicerol, DMSO, BSA, proteína gene 32, *Taq Extender*, *E.coli ss DNA binding*), entre outros (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

3.1.3 Tecnologias e métodos de detecção

A análise *in vitro* dos produtos da amplificação por PCR em tempo real é concretizada através da utilização de compostos fluorescentes. Diversos protocolos têm sido desenvolvidos para permitir a detecção dos produtos da PCR, ao longo da amplificação. Todos os protocolos requerem o uso de um termociclador de PCR em tempo real específico, bem como capilares de vidro onde se desenvolve a reação em cadeia da polimerase. Estes equipamentos incluem ainda um sistema óptico, uma fonte de iluminação ultra-violeta e um detector de fluorescência (Schulz *et al.*, 2006).

O termociclador procede às oscilações de temperatura necessárias para a concretização dos três ciclos da PCR. As variações da temperatura são obtidas através da circulação de ar aquecido a partir de uma bomba de calor e controladas numa câmara técnica. Esta reação ocorre em capilares de vidro de borossilicato, que apresentam uma superfície específica elevada para que ocorra um equilíbrio rápido entre a temperatura do ar e os componentes da

reação. Desta forma, um ciclo de amplificação pode ser concluído em menos de 30 segundos. As propriedades ópticas do vidro de borossilicato estão optimizadas para a quantificação da fluorescência. A unidade óptica do aparelho pode ser constituída por seis ou sete canais de detecção que medem a luz emitida em comprimentos de onda diferentes. Os resultados da fluorescência medida podem ser monitorizados a cada instante no computador que se encontra ligado ao sistema (Silva *et al.*, 2007; Schroeder *et al.*, 2003).

Os métodos químicos de fluorescência utilizados na PCR em tempo real são hoje em dia diversificados, recorrendo todos eles a um composto fluorescente cujo sinal é passível de ser detectado por um laser do termociclador ao longo do processo. De acordo com a literatura, estes métodos podem ser agrupados em dois grandes grupos de acordo com o tipo do composto fluorescente e respectivo comportamento durante o processo.

Serão considerados os seguintes grupos de compostos: corantes intercalantes e sondas de sequência específica (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008)

3.1.4 Corantes intercalantes

Os corantes intercalantes são fluorocromos sem especificidade para uma sequência particular de DNA, que se intercalam na dupla cadeia de qualquer produto da PCR permitindo a sua detecção. Contudo o correto *design* dos oligonucleotídeos iniciadores confere elevada especificidade da detecção e quantificação a estes métodos. Neste domínio, a primeira tecnologia desenvolvida foi patenteada pela Molecular Probes®, Inc, em 1990, sendo denominada de *SYBR® Green*. Recentemente foram desenvolvidas novas moléculas: a *LCGreen® Plus* (Idaho Technology) e a *EvaGreen®* (Biotium Inc) (Romanova, *et al.*, 2009).

SYBR® Green

A tecnologia *SYBR® Green* baseia-se num conjunto de moléculas com a

capacidade de se ligar de forma covalente à dupla cadeia de DNA e quando excitadas emitem uma fluorescência verde que é medida e convertida numa quantidade de DNA (Fig. 5). Esta tecnologia beneficia do fato das moléculas *SYBR® Green* não interferirem com a atividade da maioria das nucleases e das DNA polimerases e de aquelas apresentarem elevada afinidade com a dupla cadeia de DNA, o que é bastante útil na detecção de amostras de DNA com um baixo número de cópias (Mackay *et al.*, 2007).

No início do processo a fluorescência é reduzida, visto que as moléculas *SYBR® Green* livres não estão ligadas ao DNA de dupla cadeia e como tal, o sinal produzido é mínimo. Ao longo do processo, após a detecção dos *primers*, quantidades crescentes dos fluorocromos ligam-se à dupla cadeia de DNA pré-sintetizada pela enzima Taq DNA polimerase. No fim da fase de extensão de cada ciclo, a fluorescência é monitorizada e quantificada e, conseqüentemente o DNA amplificado é determinado (Correia, 2007; Mackay *et al.*, 2007).

A literatura refere que o coreto desenho dos oligonucleotídeos iniciadores torna-se determinante na especificidade do DNA a amplificar. Contudo, alguns estudos demonstraram que a *SYBR® Green* liga-se preferencialmente a produtos da PCR cuja temperatura de desnaturação seja superior, indicando a sua potencial preferência por regiões ricas em guanina e citosina. Desta forma, a especificidade dos resultados deve ser validada através de uma análise da temperatura de *melting* (Correia, 2007; Mackay *et al.*, 2007).

Como acontece com qualquer ligação da molécula de DNA, o *SYBR® Green* pode causar mutações e trata-se de um possível agente cancerígeno, no entanto é mais seguro e mais fácil de eliminar comparativamente ao brometo de etídio (Mackay *et al.*, 2007).

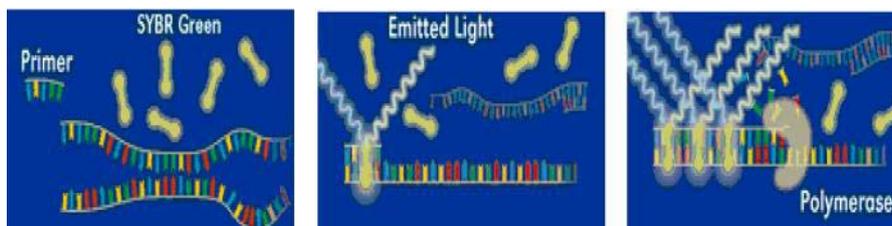


Figura 5 - Representação da molécula SYBR® Green (azul) intercalada na dupla cadeia de DNA (verde). (Extraído de (A) - <http://www.fleury.com.br/Medicos/SaudeEmDia/ManualHematologia/pages/PCRQuantitativoemTimePCR.aspx>, acessado a 26.11.2009; (B) - <http://homepages.strath.ac.uk/~dfs97113/BB310/lect403.html>, acessado a 14.12.2009).

A tecnologia SYBR® Green apresenta como principais vantagens a grande sensibilidade, o reduzido custo e a facilidade de manuseamento. Em contrapartida, apresenta como principal desvantagem a possibilidade de ligação a todo o DNA em cadeia dupla, durante a reação de polimerização, incluindo os dímeros de iniciadores e outros produtos não específicos, o que se pode traduzir numa subestimação da concentração do fragmento alvo. Além disso, a detecção com SYBR® Green exige uma otimização extensiva, uma vez que não é específico para uma determinada sequência de DNA. Desta forma, torna-se imperativo o acompanhamento dos ensaios de forma a validar os resultados (Mackay *et al.* 2007; Oliveira 2009).

Sondas de sequência específica

As sondas, lineares ou em alça, são oligonucleótidos que requerem um fluorocromo que é adicionado a uma sonda com especificidade para uma dada sequência de DNA e que detectam exclusivamente a dada sequência em todos os produtos da PCR (Watrob *et al.*, 2003).

Estas tecnologias permitem que o resultado possa ser monitorizado em tempo real, através do computador da plataforma de instrumentação. A transferência de energia de um marcador fluorescente para um segundo, conceito denominado na literatura inglesa como *Fluorescence resonance energy transfer (FRET)*, é uma propriedade que depende da interacção molecular entre dois fluorocromos (molécula repórter e molécula *quencher*) e é

determinada pela distância física entre as duas moléculas (Pelt-Verkuil *et al.*,2008).

A emissão de energia do repórter (molécula dadora) é absorvida pelo do *quencher* (molécula receptora) levando ou à extinção da fluorescência ou ao *autoquenching*. Este efeito de *quenching* mútuo (entre as duas moléculas) é determinado pela sua sobreposição espectral (comprimento de onda a que ambas emitem ou absorvem radiação) e pela distância física entre ambas (Fig. 4). A distância crítica entre os dois fluorocromos pode variar desde poucas unidades de Angstroms (o equivalente à dimensão de um único nucleótido) até ao comprimento de diversos nucleótidos que determina a quantidade obtida de *quenching*. Uma vez excedida esta distância crítica, a fluorescência da molécula repórter deixará de ser absorvida (Watrob *et al.*, 2003; Pelt-Verkuil *et al.*,2008).

Nucleotídeos específicos do produto da PCR

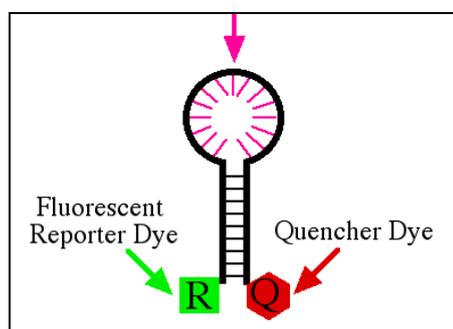


Figura 6 – Representação de um oligonucleotídeo com estrutura terciária tipo *hairpin-loop* utilizado como *molecular beacons* (Adaptado de <http://www.bio.davidson.edu/Courses/genomics/method/beacon1.gif>, acessado a 10.02.2010).

As moléculas repórter e *quencher* estão posicionadas em ambas as extremidades do oligonucleotídeo permitindo assim, que os fluorocromos estejam bastante próximos um do outro. Os *molecular beacons* não hibridizados retêm a estrutura *hairpin-loop*, o que demonstra que nenhum sinal fluorescente emitido pela molécula repórter é absorvido devido à forte proximidade da molécula *quencher*. Os *molecular beacons* hibridizados até

uma dada região complementar do DNA alvo adoptam uma estrutura linear, em vez da estrutura *hairpin-loop*, com a consequência de que ambas as moléculas fluorescentes permanecerão espacialmente afastadas. Este facto provocará uma significativa redução da actividade de absorção da molécula *quencher*, e consequentemente a fluorescência escapará e será registada (Watrob *et al.*, 2003; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Na prática, esta tecnologia tem sido utilizada para quantificar e caracterizar DNA alvo amplificado, bem como, monitorização de polimorfismos genéticos em organismos (exemplo: SNPs ou polimorfismos de nucleótidos únicos (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Existem vários tipos de *molecular beacons*, nomeadamente, os *primers* „Scorpion□ e “Sunrise□ ou tecnologias derivadas daquelas, como as sondas *TaqMan*®.

Sondas *TaqMan*®

A tecnologia *TaqMan*® é uma variação dos *molecular beacons*, desenvolvida por Perkin Elmer e descrita por Holland e colaboradores, em 1991, que lançou a base das oligosondas fluorogénicas. Esta destina-se à detecção de sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR (Holland *et al.*, 1991; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A detecção e monitorização da actividade exonucleotídica 5'-3' da Taq

DNA polimerase é fundamental nesta tecnologia, sendo utilizados para tal, dois *primers* específicos de uma determinada sequência de DNA e uma sonda *Taqman*® homóloga à região do fragmento de DNA entre os *primers* (Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A sonda apresenta na extremidade 3' uma molécula que aceita a energia da molécula repórter e a dissipa na forma de luz ou calor, designada na

literatura como *quencher* e na extremidade 5' um fluorocromo repórter (Heid *et al.*, 1996; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A proximidade física da molécula repórter e do *quencher* no princípio da análise suprime a detecção da fluorescência daquele pela transferência de energia Förster (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008; Oliveira, 2009). Na fase de hibridação do PCR, as sondas vão-se ligar à sequência alvo com a qual apresentam uma total complementaridade (Fig. 7). Posteriormente, as sondas *TaqMan*® hibridizam e são detectadas pela enzima *Taq* DNA polimerase que a hidrolisa pela sua actividade exonucleotídica 5'→3' (Fig. 8). Este processo conduz à separação do *quencher* da molécula repórter, durante a extensão resultando num aumento exponencial da intensidade de fluorescência até um ponto onde pode ser detectado, ultrapassando o limiar CT (Novais e Pires-Alves 2004; Ferro 2005; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). É possível então estabelecer uma relação inversa entre o número de moléculas de DNA iniciais na reação e o valor de CT, que é a base para os cálculos na PCR em tempo real. (Alonso *et al.*, 2003).

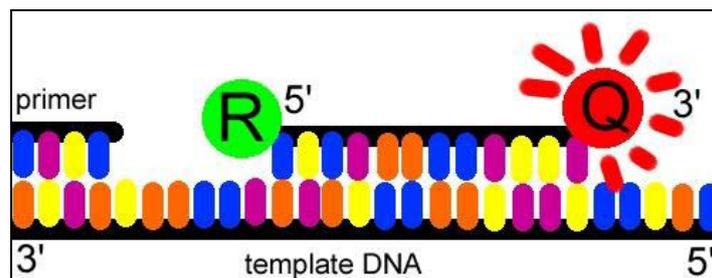


Figura 07. Hibridação das sondas *TaqMan*®. R: molécula repórter (emite fluorescência), Q: *Quencher* (absorve fluorescência da sonda intacta) (Adaptado de http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico_o_2009/13_PCR_tempo_real.pdf, acedido a 26.11.2009).

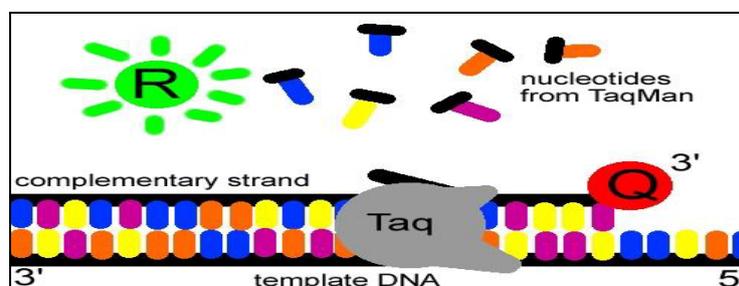


Figura 08 – Hidrólise das sondas *TaqMan*®. R: molécula repórter (emite fluorescência), Q: *Quencher* (absorve fluorescência da sonda intacta) (Adaptado de

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Pierce/realtimemcr.htm>, acessado a 10.02.2010).

O recurso à sonda *TaqMan*® provou ser um método muito específico para determinar a presença ou ausência de sequências específicas. Trata-se de uma tecnologia bastante rápida, com elevada sensibilidade e precisão e menor risco de contaminação.

Além do mais, é uma técnica que pode ter viabilidade de automatização, não necessita de processamento da amostra pós-PCR e permite que diversos

tipos de análises sejam realizados simultaneamente. Contudo é um método relativamente dispendioso, pelo fato de exigir duas moléculas (repórter e *quencher*) ligadas às extremidades da sonda, e complexo em termos de planejamento pois requer uma amplificação e uma hidrólise eficientes (Novais e Pires-Alves 2004; Mackay *et al.*, 2007; Oliveira, 2009).

3.1.5 Análise dos resultados obtidos

A análise das curvas de *melting* é uma abordagem clássica largamente utilizada para proceder à análise dos resultados obtidos na PCR em tempo real. Estas curvas representam a temperatura em função da fluorescência e dependem do tamanho e composição em bases do produto amplificado. Frequentemente obtêm-se através de aumentos sucessivos da temperatura nos poços da reação até se perder a fluorescência devido à desnaturação do DNA. Quando se atinge a temperatura de *melting* da sequência alvo observa-se uma quebra abrupta da fluorescência; caso se observem diminuições adicionais da fluorescência tal pode representar contaminação ou insuficiente especificidade dos parâmetros do PCR. A temperatura de *melting* de cada produto de amplificação depende do seu conteúdo em guanina e citosina

(G+C), comprimento e características da seqüência, permitindo distinguir diferentes produtos da PCR. Este método tem sido utilizado para avaliar a extensão de potenciais ligações não específicas do corante a qualquer produto de dupla cadeia, incluindo dímeros de oligonucleotídeos iniciadores (artefato originado pela interacção de dois *primers* durante a fase de extensão do PCR, com subsequente formação de um produto da PCR pela extensão a partir da extremidade 3' de um ou de ambos os *primers*) e produtos de amplificação não específicos (Espy *et al.*, 2006; Mackay *et al.*, 2007).

As principais vantagens das curvas de *melting* estão relacionadas com a possibilidade da confirmação da(s) sequência(s) do(s) produto(s) da PCR, com a sua alta especificidade (cada produto tem a sua própria temperatura de *melting*), com o reduzido risco de contaminação (o capilar utilizado é fechado), com o facto de diferenciar produtos da PCR específicos dos inespecíficos e com a possibilidade de caracterizar polimorfismos de inserção/delecção, genotipar SNPs e detectar mutações (Espy *et al.*, 2006; Carvalho, 2007; Mackay *et al.*, 2007).

Análise HRM

A análise HRM (*High Resolution Melting*) é um método pós-PCR bastante recente, homogéneo, rápido, simples e que se realiza em sistema fechado, que foi desenvolvido tendo por base as enormes potencialidades da análise clássica das curvas de *melting*. É uma técnica que consiste na caracterização de amostras de DNA de acordo com seus comportamentos de dissociação durante a transição de DNA dupla cadeia para DNA de cadeia simples com o aumento da temperatura, recorrendo a corantes fluorescentes intercalantes que se ligam ao DNA de dupla cadeia, sendo o fenómeno monitorizado através da PCR em tempo real (Ruan *et al.*, 2010; Nagy *et al.*, 2009).

Estes corantes apresentam baixa toxicidade para a reacção, podendo, portanto, serem usados em concentrações elevadas a fim de saturar toda a dupla cadeia de DNA das amostras. Isso significa, que os sinais de

fluorescência medidos têm maior fidelidade (sensibilidade e resolução), aparentemente devido à menor proporção de redistribuição de corante das regiões desnaturadas para aquelas ainda em dupla cadeia (Romanova *et al.*, 2007).

Durante a PCR, quando ocorre a desnaturação do DNA a fluorescência desaparece originando a curva de *melting*. As diferenças da composição de bases do DNA podem ser detectadas e comparadas pela curva e temperatura de *melting* (T_m). A análise dos dados é feita com um *software* específico (Reed, *et al.*, 2004; Krypuy, *et al.*, 2006; Herrman *et al.*, 2007; Tesoriero, 2008; Villela *et al.*, 2010).

Para cada sequência existe uma curva padrão e temperatura de *melting* específica (Figura 09). Tal fato faz com que esta técnica apresente uma vasta gama de aplicações, nomeadamente detecção de mutações, triagem de heterozigotias, genotipagem, caracterização de blocos de haplótipos, análise de metilação de DNA, mapeamento de DNA, prevalências alélicas numa população e identificação de espécies (Herrman *et al.*, 2007; Tesoriero, 2008; Villela *et al.*, 2010).

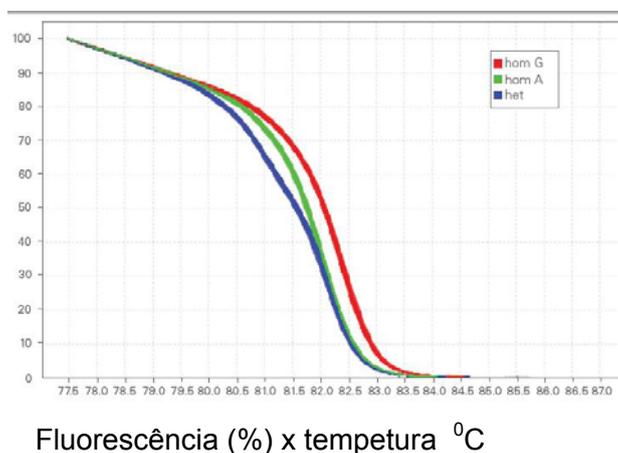


Figura 09 – Curva HRM. O gráfico demonstra um decréscimo na fluorescência quando ocorre a passagem da estrutura em cadeia dupla para a cadeia simples. Vermelho = homozigótico com guanina; verde = homozigótico com adenina; azul = heterozigótico (Adaptado de <http://www.appliedbiosystems.com>, acessado a 12.12.2012).

3.1.6 Quantificação dos resultados da qPCR

Após a detecção e amplificação do DNA é necessário quantificá-lo. A técnica da PCR em tempo real permite que a quantificação do DNA possa ser realizada de forma absoluta ou relativa. Assim, recorre-se frequentemente a dois métodos para quantificar os resultados da PCR em tempo real: o método da curva padrão e método da comparação do limiar da fase exponencial (Makay *et al.*, 2006; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Na quantificação absoluta determina-se o número exacto de moléculas (número de cópias de DNA ou nanogramas de DNA). Regra geral, trata-se de um método de determinação da concentração inicial de uma dada amostra de concentração desconhecida a partir de uma curva padrão, obtida após diversas análises precisas e consistentes em amostras de concentração conhecida. Para tal, o valor de CT (de uma dada amostra de concentração desconhecida) é projectado num gráfico CT em função do logaritmo da concentração de DNA, onde está representada a curva padrão, e a partir da qual se extrapola a concentração de DNA da amostra em questão (Moore., *et al.* 2010).

O método mais utilizado para quantificação relativa é o da comparação do limiar da fase exponencial (*threshold*), sem recurso a curvas padrão. Este método consiste na comparação dos valores CT das amostras com um controle. Os valores de CT de ambos (amostra e controle) são normalizados a um gene endógeno apropriado. O método comparativo CT também é conhecido como o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{amostra} - \Delta CT_{referência}$. Nesta equação $\Delta CT_{amostra}$ é o valor de CT para qualquer amostra normalizada (ao gene apropriado) e $\Delta CT_{referência}$ é o valor de CT para o controlo normalizado (ao gene apropriado). Para que o cálculo de $\Delta\Delta CT$ seja válido, a eficiência da amplificação da amostra alvo e da referência endógena deve ser aproximadamente igual. Tal pode ser estabelecido visualizando a variação do ΔCT de acordo com a diluição do modelo (Livak e Schmittgen, 2001; Mackay *et al.*, 2006; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A quantificação relativa é aplicável na quantificação da expressão génica (quando esta é medida em valores múltiplos de expressão) e tem sido utilizada na monitorização da

atividade do sistema imunitário após transplantação de órgãos (Sabek *et al.*, 2002).

3.1.7 Vantagens da técnica de PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real apresenta como principais vantagens: simplicidade, especificidade, elevada sensibilidade no que se refere à utilização de uma sonda ou de um corante apropriado, rapidez, redução do risco de contaminação pós amplificação, elevado potencial de produção, introdução contínua de novos químicos, detecção de quantidades relativamente pequenas de DNA alvo (três picogramas de material, o que é cerca de 1000 vezes menos material genético), facilidade de quantificação, utilização de uma instrumentação de maior fiabilidade e uma melhoria nos protocolos tem feito com que a tecnologia de PCR em tempo real seja a tecnologia de referência para a detecção de DNA. Na verdade, esta tecnologia baseada na reacção de hibridização FRET permite a eliminação de alguns passos intermédios, favorecendo a automatização e a capacidade da análise em simultâneo de um grande número de amostras. Esta técnica inclui um menor risco de contaminação, pois os sistemas são fechados e não exigem manipulação do conteúdo de reacção após a conclusão da PCR. Uma vantagem adicional é o acompanhamento do restante produto no tubo de reacção, encurtando assim consideravelmente o tempo de ensaio. Finalmente, os resultados obtidos podem ser rápida e facilmente confirmados através da análise das curvas de *melting* (Watzinger *et al.*, 2006; Mackay *et al.*, 2007; Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

A qPCR requer uma elevada competência profissional e assistência técnica muito especializada e finalmente é uma tecnologia com um custo inicial muito elevado devido ao preço do equipamento, o que impede que muitos laboratórios estejam equipados com esta tecnologia. Felizmente, o preço destes instrumentos está a ser reduzido em virtude da evolução tecnológica das lâmpadas dos equipamentos que estão a incorporar LEDs em detrimento do laser, halogêneo ou tungstênio. Nesta técnica recorre-se frequentemente a

corantes interligantes, que têm a desvantagem de se ligar a qualquer outro produto da dupla cadeia, incluindo dímeros de *primers* e outros produtos de amplificação não específicos, originando assim emissão de fluorescência que pode não corresponder ao DNA alvo (Alonso, 2008; Martinhago *et al.* 2010; George *et al.* 2009). Outra desvantagem deve-se à incompatibilidade da técnica com alguns químicos que emitem fluorescência (Watzinger *et al.*, 2004)

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, R., Boyd, C., Coulson, S.A., Dial, J., Dodson, K.D., Ellis, D., *et al.* (2009). Forensic Science. California: Salem Press, Inc.

Albertini, R. *et al.* Quimioluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para sala de aula. Química Nova, São Paulo, v.21, n.6,p. 772-779, mai. 1998.

Alonso, A.,Martín, P., Albarrán, C., García, P., Primorac, D., García, O., Simón, L.F., García-Hirschfels, J., Sancho, M., Fernández-Piqueras, J. (2003). Specific quantification of human genomes from low copy number DNA samples in forensic and ancient DNA studies. Croatian Medical Journal 44, 273-280.

Albuquerque, Trícia . Identificação humana através de marcadores moleculares. Caderno La Salle XI, Canoas, v. 2, n. 1, p. 265 - 270, 2004.

Almeida, Juliana Piva de . Influência dos testes de triagem para detecção de sangue nos exames imunológicos e de genética forense. 2009. 49f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

AmpFISTR® MiniFiler® PCR amplification kit user guide, part #: 4374618.
Foster City, CA: Applied Biosystems, 2011(b).

Applied Biosystems. AmpFISTR® NGM® PCR amplification kit user guide, part #: 4415020. Foster City, CA: Applied Biosystems, 2011(c).

Applied Biosystems. AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR amplification kit user guide, part #: 4440211. Foster City, CA: Applied Biosystems, 2011(a).

Ausabel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A., STRUHL, K. Current protocols in Molecular Biology. New York: Wiley & Sons, 1996. 4800 p.

Barea, J.A. *et al.* Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerase em cadeia (PCR). *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2004;26(4):274-281.

Barni, Filippo; Lewis, Simon W.; Berti, Andrea; Miskelly, Gordon M.; Lago, Giampietro. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. Disponível em: <http://chemfaculty.lsu.edu/mccarley/Chemistry%202001/Articles_SP2008/Barni_Talanta_Luminol_Forensics.pdf>. Acesso em 05 mai. 2011.

Baechte, F. Samuel.; Comey, Catherine T. Applications of Molecular Biology to Analyses of Forensic Evidence. *Biologicals*, v. 24, p. 201 - 205, 1996.

Benecke, Mark. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. *Naturwissenschaften*, v. 84, p. 181 - 188, 1997.

Benecke, Mark. Coding or non-coding, that is the question. *EMBO reports*, v.3, n. 6, p. 498 - 502, 2002.

- Bonaccorso, Norma. *Análise Forense de DNA*. São Paulo: 2004. 24p.
Tese(Monografia apresentada no Concurso de Ingresso para professor da ACADEPOL) – Academia de Polícia de São Paulo. Disponível em: <http://www.peritocriminal.com.br/dnaforense.htm>. Acesso em: 18 mai. 2006.
- Borém, A.; Ferraz, D.A.; Santos, F. DNA e Direito. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 22, set-out. 2001.
- Butler, J.M., Appleby, J.E., Liu, D., Duewer, D.L. (2005) Locus-specific brackets for reliable typing of Y-chromosome short tandem repeat markers. *Electrophoresis* 26: 2583-2590
- Brown, T.A. *Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma introdução*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 2001. 376p.
- Bodowle, B. *et al.* The Presumptive Reagent Fluorescein for Detection of Dilute Bloodstains and Subsequent STR Typing of Recovered DNA. *Journal Of Forensic Sci-ences* 2000; 45(5):1090-1092.
- Campan M., W.D.J., Trinh B., Laird P.W. (2009). MethyLight. *Methods in molecular biology* 507, 325-337.
- Chemello, Emiliano. *Ciência forense: Manchas de sangue*. Disponível em: <http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007jan_forense2.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2011.
- Correia, F.L.A. (2007). *Desenho e montagem de método rápido para diagnóstico da Borreliose de Lyme por PCR em tempo real*. Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 70 pp.
- Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques*. 2007;42:343-52, 2012.

Correia, F.L.A. (2010). Desenho e montagem de método rápido para diagnóstico da Borreliose de Lyme por PCR em tempo real. Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 70 pp.<http://www.webartigos.com/artigos/ciencias-forenses-em-sala-de-aula/9772/> acesso em 08/06/2013.

Coutinho *et al.* Técnicas com Marcadores Moleculares Usadas nas Ciências da Saúde. Revista Brasileira de Ciências da Saúde. Volume 10 Número 2. Páginas 177-188 2006

Cruz, M.C, Guedes, J.T, Santos, E.P, Aquino, G.B. A Química Revela o Crime CSI: . A Química revela o crime Interfaces Científicas -Saúde e Ambiente • Aracaju • V.01 • N.02 • p. 53-59 • fev. 2013

Dias, José Renato Moreira. Desenvolvimento e otimização de sistemasquimioluminescentes de detecção de espécies químicas em águas. 2010. 154f. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química da Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2010.

Duarte, Francisco .A. M.; Perez, Augusto.M.; Pena, Sergio.D.; de Barros, Margareth. P.M.; Rossi, Elsie O. A avaliação do DNA como Prova Forense. Ribeirão Preto: FUNPEC. 2001. 283p.

Dei Malatesta, N. F. A Lógica das provas em Matéria Criminal. Editora Servanda. Campinas/ SP. 2009.

Dolinsky, L. C and L. M. C. V, Pereira. DNA Forense: artigo de Revisão. Saúde e Ambiente e Revista, Duque de Caxias, v.2, n.2, p.1 – 22, jul – dez 2007.

Declave, Bruno. Experimento policial (fenolftaleína). Disponível em:
<<http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=1092&sid=3>>.
Acesso em: 10 abr. 2011.

Dias Filho, Claudemir Rodrigues. A Perícia Criminal e a Interdisciplinaridade no Ensino de Ciências Naturais. *Química Nova Na Escola*, São Paulo, v. 32, n. 2, p.67-72, maio 2010.

Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenac, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., Smith, T.F. (2006). Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 19,165–256.

Experimentos de demonstração para sala de aula. *Química Nova*, São Paulo, n. , p.1-8, 19 maio 1998.

Edwards, M.C., *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4791. F13A1. 123.

Eichlerl, M. e Del Pino, J.C. Jornais e revistas on line: busca por temas geradores. *Química Nova na Escola*, n. 9, p. 6-8, 1999.

Fregeau CJ, Germain O, Fourney RM. Fingerprint enhancement revisited and the effects of blood enhancement chemicals on subsequent profiler Plus fluorescent short tandem repeat DNA analysis of fresh and aged bloody fingerprints. *J Forensic Sci.* 2000 Mar;45(2):354-80.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília, EMBRAPA, 220p. 1995.

Ferreira, Ernesto Correa; Rossi, Adriana Vitorino. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n6a/12777.pdf>>. Acesso em 14 fev. 2011.

Figini ARL, Leitão e Silva JR, Jobim LF, da Silva M. Identificação Humana. 2.ed. Campinas: Millenium editora. 2003.

Filho, Claudemir Rodrigues Dias; Antedomenico, Edilson. A perícia criminal e a interdisciplinaridade no ensino de ciências naturais. Disponível em: <http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/diaadia/diadia/arquivos/File/conteudo/artigos_teses/2010/Ciencias/Artigos/pericia_criminal.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2011.

Francischini, L. *et al.* Development and use of triplex real time PCR assay for human DNA quantification in forensic samples. *Saúde, Ética & Justiça*. 2013;18(Ed. Especial):72-8.

Gerhardt. Source: *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 25 (1994), pp. 293-32

Gross, Ann Marie; Harris, Katy A.; Kaldum, Gary L. The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. Disponível em: <<http://www.bioforensics.com/conference04/Serology/Luminol.pdf>>. Acesso em 03 abr. 2011.

Herrmann, M. G., Durtsch U, J.D., Wittwerl, C. T., Voelkerding, K.V. (2007). Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clinical Chemistry* 53, 1544-1548.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. E Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7276-7280.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology Nature Publishing Company* 11, 1026-1030.

Heid. C.A., S., J., Livak, K.J., Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6, 986-994.

Hoffmann, K. *et al.* Plexor™ technology vs. TaqMan® Assays. Disponível em: <<http://www.promega.com/techserv/apps/qpcr/PlexorNotes.pdf>> Acesso em: 6 out. 2007.

Hooper, K. Real power for real-time PCR. Disponível em: <<http://www.promega.com/techserv/apps/qpcr/PlexorNotes.pdf>> Acesso em: 5 out. 2007.

International Human Genome Sequencing Consortium Publishes Sequence and Analysis of the Human Genome. February 12, 2001

Jeffreys, A.J.; Wilson. V.; Neumann,R.;Keyte.J. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction towards DNA fingerprinting of singlecells. *Nucleic Acids Res.* V.16. p. 10953 -71, 1988

Jobim, L. F; L. R, Costa e M, da Silval. *Identificação Humana: Identificação Médico Legal, Perícias Odontológicas, Identificação Humana pelo DNA.* 2ª Ed. Editora Millennium. Campinas/ SP. 2012.

Juliana Piva de Almeida Nadine Glesse, Cristina Bonorino Effect of presumptive tests reagents on human blood confirmatory tests and DNA analysis using real time polymerase chain reaction. **Forensic Science International.** Volume 206, Issue 1 , Pages 58-61, 20 March 2011

Krenke, B.E *et al.* Development of a novel, fluorescent, two primers approach to quantitative PCR. *Profiles in DNA*, Promega Corporation, Vol.8, Nº.1, pp.3-5, 2005.

Koreth , O'Leary JJ, Mc Gee O'Dj . Microsatellites and PCR genomic analysis. J Pathol 178:239–248. 1996

Lytle, L. T.; Hedgecock, B. A. Chemiluminescence in the visualization of forensic bloodstains. Disponível em: <http://www.forensictv.net/Downloads/luminol/chemiluminescence_in_the_visualization_of_forensic_bloodstains_by_lytle_and_hedgecock.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2011.

Leite, Oldair Donizeti; Fatibello-Filho, Orlando; Rocha, Fabio R. P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimioluminescência. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n2/19285.pdf>>. Acesso em 04 abr. 2011.

Lewin, B. Genes VII. Tratado de biologia molecular. Editora ARTMED. São Paulo, p.960. 2001.

Lima, L.O. Direito médico – Utilização de polimorfismo em Análises forenses. Edição: 2006. Disponível em: <<http://www.geneticaffccmpa.fch.br>>. Acesso em: fev.2010.

Livak, K.J. *et al.* Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic, 2011.

Liva, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25, 402-408.

Lee, H.C.; Gaensslen, R.E.; Bigbee, P.D.; Kearney, J.J. Guidelines for the collection and preservation of DNA evidence. Journal of Forensic Identification, n.41,p.344-356, 1991.

Lee, Henry.C.; Ladd, Cerll. Preservation and Collection of Biological Evidence. Croatian Medical Journal, v. 42, n. 3, p. 225 - 228, 2001.

Lagoa, A.M., Magalhães, T., Pinheiro, M.F. (2008). Genetic analysis of fingerprints-Could WGA or nested-PCR be alternatives to the increase of PCR cycles. Current protocols in Molecular Biology. New York:Wiley & Sons, 1996. 4800 p.\

Manual do usuário do kit AmpF_ STR® NGMTM PCR Amplification (P/N 4425511 Rev. B 11/2009)

Malaghini, Marcelo.; Alonso, Carlos A.M.; Dall’Stella, Renato.; Schneider,Vicente 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: 08 mar. 2006.

Martínez-Serra, J., Maffiotte, E., Gutierrez, A., Durán, M.A., Amat, J.C., Besalduch, J. (2009). New real-time PCR-based method for the joint genotyping of JAK2 (V617F) with inherited thrombophilic F5 and F2 mutations. Clinica Chimica Acta 410, 59-63.

Martinhago, C., Vagnini, L., Petersen, C., Mauri, A., Baruffi, R., Oliveira, R., Franco, J.Jr. (2010). Development of a real-time PCR method for rapid sexing of human preimplantation embryos. Reproductive BioMedicine Online 20, 75-82.

MarquetteA, Cristophe A.; BLUM, Loic J. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/w8j7572033668574/fulltext.pdf>>. Acesso em 15 abr. 2011.

Mackay, I. M., Mackay, J.F., Nissen, M.D., SLOOTS, T.P. (2007). Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.),

Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization .
Caister Academic Press Norfolk, UK.

Monteiro, Inês Viana de Paula. Vestígios hemáticos no local de crime. Sua importância médico-legal. 2010. 149f. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade do Porto, Porto, 2010.

Mozayani, A., & Noziglia, C. (2006). The Forensic Laboratory Handbook: Procedures and Practice. New Jersey: Human Press.

Novais, C.M., PIRES-ALVES, M. (2004). Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Edição nº 13, 4 pp.

Nadir, Higuchil, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology Nature Publishing. Company 11, 1026-1030.

Pena, Sérgio D.J. Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. In: Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas, v. 20, p. 447 - 460, 2005.

Promega. Plexor® HY System for the Bio-Rad iQ™5 Real-Time PCR Detection System. Madison, WI: Promega. Rohland N, Hofreiter M.

Primorac, Dragan.; Schanfield, Moses.S.; Damir. Application of Forensic DNA Testing in the Legal System. Croatian Medical Journal, v. 41, n. 1, p. 32 - 46, 2000.

Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., Hays, J.P. (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer, 332 pp.

Pena, S.D.J. Segurança pública: determinação de identidade genética pelo DNA.2009

Ponce, Ana Castelló; PASCUAL, Fernando A. Verdú. Critical revision of presumptive tests for bloodstains. Disponível em: <<http://projects.nfstc.org/workshops/resources/articles/Critical%20Revision%20of%20Presumptive%20Tests%20for%20Bloodstains.pdf>>. Acesso em 30 mar. 2011

Pitarch, Pascual, Gil; Pascual, Fernando Verdú; Ponce, Ana Castelló; Muñoz, Negre. Técnicas de criminalística en manchas de sangre: fator ambiental en las pruebas de orientación. Disponível em:<<http://revistas.ucm.es/med/18873278/articulos/REML1010220004A.PDF>>. Acesso em: 30 mar. 2011.

Ponce, A. C., Pascual, F. A. V. Critical Revision of Presumptive Tests for Bloodstains. Forensic Science Communications. Vol. 1, n°2, july 1999. Disponível em: <http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/july1999/ponce.htm>

Quickenden, Terence I.; Cooper, Paul D. Increasing the specificity of the forensic luminol test for blood. Disponível em: <http://www.forensictv.net/Downloads/luminol/increasing_the_specificty_of_the_forensic_test_for_blood.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2001.

Reis, M.A, Pinto, E.R. Aumentando a Eficiência e Poder de Resolução para aplicações do DNA Forense. XVI Encontro Nacional de Ensino de Química (XVI ENEQ) e X Encontro de Educação Química da Bahia 2012

Romanova, N., Corredor, J.C., Nagy, E. (2009). Detection and quantitation of fowl adenovirus genome by a real-time PCR assay. Journal of Virological Methods 159, 58-63.

Santos, Roberto Márcio Souza; Santos, Maiza Ferreira; Costa, Maria de Fátima Dias. Quimioluminescência e Bioluminescência. Disponível em:

<[http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1993/vol16n3/v16_n3_%20\(6\).pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1993/vol16n3/v16_n3_%20(6).pdf)>.

MAcesso em 14 fev. 2011

Schulz, I., Schneidera, P.M., Rothschilda, M.A. (2006). Absolute quantification of forensic casework samples using quantitative real-time PCR (qPCR) methods. International Congress Series 1288, 765-767.

Sabek O., Dorak M.T., Kotb M., Gaber A.O., Gaber L. (2002). Quantitative detection of Tcell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. Transplantation 74, 701-707.

Silva, M.F., Ramos, J., Pelerito, A., Monteiro, L. (2007). O Potencial da PCR em tempo real no diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*. Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde 4, 10 pp.

Silva, R. R., Augustini, B.C., Silva A.L.L. and Frigeri, H.R. (2012). Luminol in the forensic science. Journal of Biotechnology and Biodiversity. Vol. 3, N. 4: pp. 172-177, ISSN: 2179-4804

Vaz, Josiana Adelaide (2008). Metodologias de detecção de vestígios biológicos forenses. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro.

Vieira, Daniel P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. Disponível em: <http://www.etall.hpg.ig.com.br/aula1b.pdf> Acesso em: 01 nov. 2006.

Watrob, H.M., PAN, C.P., BARKLEY, M.D. (2003). Two step FRET as a structural tool. J Am Chem Soc 125, 7336–7343.

Zuccarelli, G., Alechine, E., Caputo, M., Bobillo, C., Corach, D., (2010). Rapid screening for native american mitochondrial and Y-chromosome

haplogroups detection in routine DNA analysis. Forensic Science International: Genetics, in press.

Watzinger, F., Suda, M. , Preuner, S., Baumgartinger, R., Ebner, K., Baskova, L., Niesters, H.G.M., Lawitschka, A., Lion, T. (2004). Real-Time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. Journal of Clinical Microbiology 42, 5189-5198.

Watzinger, F., Ebner, K., Lion, T. (2006). Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Molecular Aspects of Medicine 27, 254-298.

Webgrafia

<http://www.appliedbiosystems.com>, Acessado a 20.10.12

<http://www.roche-applied-science.com>, Acessado a 22.10.12.

<http://www.ependorf.com>, Acessado a 25.10.12.

<http://www.corbette-research.com>, Acessado a 8.11.12.

<http://www.qiagen.com>, Acessado a 15.11.12.

<http://www.cepheid.com>, Acessado a 01.12.12.

<http://www.bio-rad.com>, Acessado a 14.12.12.

<http://nobelprize.org>, Acessado a 16.12.2012.

<http://www.gencompare.com/qpcr.htm>, Acessado a 23.03.2013.

<http://www.idahotech.com/LCGreen/>, Acessado a 23.03.2013.

<http://www.gene-quantification.com>, Acessado a 20.04.2013.

<http://www.uniscience.com.br/site/pdf/HRM.pdf>, Acesado a 23.03.2013

http://www.ambitojuridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=11630&revista_caderno=22 acessado em 15.04.13

<http://hdl.handle.net/10198/7519> acessado em 30-04-13

<http://hdl.handle.net/10198/7519> Estudo forense do sangue
.Volume 206, Issue 1 , Pages 58-61, 20 March 2011