

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**UTILIZAÇÃO DO KIT *DNA IQ™ SYSTEM* NA EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE  
DIFERENCIAL EM AMOSTRAS COLETADAS DE VÍTIMAS DE CRIME SEXUAL**

**GISLEYDE VALÉRIO BASTOS**

**JOÃO PESSOA**

**2018**

**GISLEYDE VALÉRIO BASTOS**

**UTILIZAÇÃO DO *KIT DNA IQ™ SYSTEM* NA EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE  
DIFERENCIAL EM AMOSTRAS COLETADAS DE VÍTIMAS DE CRIME SEXUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Plinio Delatorre

Coorientador: Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima

**JOÃO PESSOA**

**2018**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

B327u Bastos, Gisleyde Valerio.

Utilização do kit DNA IQ System na extração de DNA por lise diferencial em amostras coletadas de vítimas de crime sexual / Gisleyde Valerio Bastos. - João Pessoa, 2018.

56 f. : il.

Orientação: Plinio Delatorre.

Coorientação: Eleonidas Moura Lima.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Crime sexual. 2. Extração diferencial. 3. Partículas magnéticas. 4. DNA IQ System. I. Delatorre, Plinio. II. Lima, Eleonidas Moura. III. Título.

UFPB/BC

GISLEYDE VALÉRIO BASTOS

Dissertação de Mestrado avaliada em 11/12/2018

BANCA EXAMINADORA

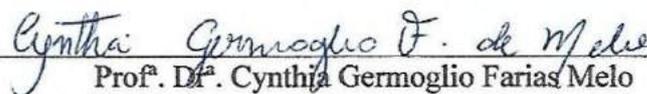
---

Prof. Dr. Plínio Delatorre  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Orientador



---

Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Interno / Titular



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cynthia Germoglio Farias Melo  
Coordenação de Medicina  
Faculdade de Ciências Médicas  
Examinador Externo / Titular



---

Prof. Dr. Vanduir Soares de Araújo Filho  
Institutos Paraibanos de Educação  
UNIPE  
Examinador Externo / Suplente



---

Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinador Interno / Suplente  
Coorientador

Dedico a minha mãe Joana pelo  
amor incondicional e ao meu pai  
José (*in memoriam*) por me  
ensinar a ter esperança sempre.

Conheça todas as teorias,  
domine todas as técnicas, mas  
ao tocar uma alma humana  
seja apenas outra alma  
humana. (Carl G. Jung)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, soberano em minha vida, meu refúgio, minha força, graças por todas as conquistas.

Agradeço imensamente ao professor Dr. Eleonidas Moura Lima pela confiança e acolhida, por assumir a orientação deste trabalho, pelo apoio e incentivo nos momentos desafiadores e por todo o conhecimento científico dispensado. Minha gratidão sempre.

Ao professor Dr. Plínio Delatorre, por quem tenho a maior estima, obrigada pelo acolhimento e incentivo.

A Dra. Sylvia Satomi Takeno Herrero, grande profissional, sempre solícita em me ajudar, agradeço o apoio, a partilha do saber e as valiosas contribuições nas correções do presente trabalho. Sua ajuda foi importantíssima.

Ao Dr. João Gonçalves de Oliveira, Laboratório de Biologia Molecular Estrutural Oncogenética (LBMEO), grata pela gentileza constante.

Obrigada a Regina Miranda, secretária do programa do mestrado, pela paciência e pelo auxílio em todas as situações que eu lhe apresentava.

A Direção Geral do Instituto de Polícia Científica do Estado da Paraíba pela concessão do ambiente e equipamentos do laboratório de DNA, assegurando a realização deste projeto.

Aos meus colegas de trabalho muito obrigada pela compreensão e por me fazerem acreditar que o sonho era possível.

Ao Dr. Vanduir Soares de Araújo Filho, meu amigo e colega de trabalho, obrigada pela paciência, pelos ensinamentos científicos, pela generosidade humana, pela impagável contribuição nas análises das amostras e na revisão crítica dos textos. Você foi fundamental para que eu desenvolvesse esta pesquisa. Ela tem muito de você.

Especialmente a Ana Carolina Bernardi Della Giustina, colega de trabalho e minha amiga para a vida inteira, obrigada pelo incentivo, pelas suas reflexões críticas, pela disponibilidade irrestrita em me ajudar, especialmente em alguns momentos mais críticos. Você foi imprescindível para a realização e conclusão do meu mestrado.

Outro especial agradecimento ao meu colega de trabalho e amigo Sérgio Marques de Lucena pelo apoio e pela valiosa ajuda na escolha e análise das amostras.

A Ludmila Borges e Pedro Rodrigues da empresa Promega que não pouparam esforços para dirimir minhas dúvidas, obrigada pelo apoio de sempre.

Minha mãe Joana Valério Sobrinha obrigada pelo carinho, compreensão, incentivo, paciência, pelo amor que nunca deixou faltar e por entender a minha ausência nos momentos de estudo.

Aos meus familiares e amigos agradeço o incentivo e a compreensão pelo meu isolamento em inúmeras tardes de domingo.

Meus colegas de turma Augusto Monteiro de Souza, Aguinaldo Luiz do Nascimento e Paulo Junio Ribeiro Oliveira, companheiros de luta, guardarei para sempre os momentos vividos com vocês durante o mestrado.

Especialmente a Andressa de Lima Liberato, uma amiga para a vida que o mestrado me ofertou, agradeço a disponibilidade em ouvir meus desabaços de tristeza e desespero, minhas explosões de alegria e por compartilhar inúmeros valores humanos que vão além do conhecimento acadêmico.

Zhilbelly de Mota Nunes obrigada pela amizade, pela partilha de bons momentos vividos no mestrado e na vida, boas risadas e algumas lamúrias.

## RESUMO

As amostras forenses decorrentes de casos de crime sexual caracterizam-se, muitas vezes, por uma mistura desequilibrada entre células epiteliais da vítima e espermatozoides do agressor. A extração de DNA por lise diferencial orgânica ainda é a metodologia rotineiramente utilizada para processar a separação de DNA masculino e feminino nestas amostras, baseada na resistência da membrana nuclear dos espermatozoides a determinados reagentes. Entretanto a técnica é extremamente morosa e utiliza solventes orgânicos tóxicos como o fenol e o clorofórmio. Modificações neste protocolo tem sido um desafio para os laboratórios forenses no mundo. O presente estudo propôs a utilização do kit de extração *DNA IQ™ System (Promega)* com partículas magnéticas para eliminação de alguns inconvenientes da técnica padrão. Para realizar uma análise comparativa entre a técnica de uso corrente e a proposta, 50 amostras de crimes sexuais foram submetidas às mesmas condições de análise pelas duas metodologias, resultando em 100 produtos de extração de fração não espermática (FNE) e 100 de fração espermática (FE). As amostras foram quantificadas por PCR em tempo real utilizando o kit *Plexor HY® System (Promega)* para avaliar a quantidade e a qualidade de DNA autossômico e de cromossomo Y recuperados. Das amostras de frações espermáticas (FE) analisadas utilizando o kit *DNA IQ™ System* 86 % apresentaram maior quantidade de DNA autossômico quantificado em comparação à extração diferencial padrão. Com relação ao DNA de cromossomo Y, 66 % das amostras extraídas utilizando a técnica com o kit comercial ofereceram maior quantidade de DNA quando comparadas com a técnica padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism® v.6.0.* e o teste de Wilcoxon mostrou que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com o valor de  $p < 0,0001$ . A presente pesquisa demonstrou que a técnica utilizando o kit *DNA IQ™ System* é mais eficiente que a técnica diferencial orgânica em todos os parâmetros analisados proporcionando a eliminação de solventes tóxicos, garantindo maior segurança ao analista forense, maior rapidez de execução da extração e quantidade e qualidade favorável de DNA recuperado. Portanto, sua implementação é indicada como método alternativo nos laboratórios forenses para análise de amostras de crime sexual.

**Palavras-chave:** Crime sexual. Extração diferencial. Partículas magnéticas. *DNA IQ™ System*.

## ABSTRACT

Forensic samples from cases of sexual crime are often characterized by an unbalanced mixture between the victim's epithelial cells and sperm cells of the offender. DNA extraction by organic differential lysis is still the methodology routinely used to process the separation of male and female DNA in these samples, based on the resistance of the nuclear membrane of the sperm cells to certain reagents. However the technique is extremely time consuming and uses toxic organic solvents such as phenol and chloroform and modifications in this protocol has been a challenge for the forensic laboratories in the world. This study propose the use of DNA extraction kit DNA IQ™ System (Promega) with magnetic particles to eliminate some drawbacks of the standard technique. To perform a comparative analysis between the current use technique and the proposed, 50 samples of sexual crimes were submitted to the same analysis conditions by the two methodologies, resulting in 100 extraction products non-sperm fraction (NSF) and 100 sperm fraction (SF) results. Samples were quantified by real-time PCR using the Plexor HY® System kit (Promega) to evaluate the quantity and quality of amplified autosomal and Y chromosome DNA. 86% of the sperm fractions (SF) from the extraction using the DNA IQ™ System kit presented higher amount of amplified DNA autosomal compared to the standard differential extraction. With respect to Y chromosome DNA, 66% of the samples extracted using the commercial kit technique offered higher amounts of amplified DNA as compared to the standard technique. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism® v.6.0 software and the Wilcoxon test showed that the differences were considered statistically significant with  $p < 0.0001$ . The research demonstrated that the technique using the DNA IQ™ System kit is more efficient than the organic differential technique in all analyzed parameters, providing the elimination of toxic solvents, guaranteeing greater security for the forensic analyst, faster execution of the extraction and favorable quantity and quality of recovered DNA. Therefore, its implementation is indicated as an alternative method in forensic laboratories to analyze samples of sexual crime.

**Keywords:** Sexual crime. Differential extraction. Magnetic particles. DNA IQ™ System.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**μL** – Microlitro

**μm** - Micrômetro

**CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa

**CODIS** - *Combined DNA Index System*

**Ct** - *Ciclo Threshold*

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DTT** - Ditioneitol

**EDTA** - Ácido etilendiaminotetracético

**FBI** - *Federal Bureau of Investigation*

**FE** - Fração espermática

**FNE** - Fração não espermática

**HCl** - Ácido Clorídrico

**IPC** - *Internal PCR control* ou controle interno de PCR

**mL** - Mililitro

**N/A** - Não analisável

**NaCl** - Cloreto de sódio

**ng** - Nanograma

**NSF** - *non-sperm fraction*

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PCR** - *polimerase chain reaction*

**RFLP** - *restriction fragment length polymorphism*

**RIBPG** - Rede Integrada de Banco de Perfis Genéticos

**RPM** - Rotação por minuto

**RT-PCR** - PCR em tempo real

**Sarcosil** - *N-Lauroylsarcosine sodium salt*

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**SF** - *sperm fraction*

**STR** - *short tandem repeat*

**Tm** - Temperatura de *melting*

**Tris** - 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanediol

**VNTR** - *variable number of tandem repeat*

**WHO** - *World Health Organization*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mostra a diferença de STRs autossômicos em indivíduos distintos. ....	20
<b>Figura 2.</b> Quebra das pontes dissulfeto pelo DTT. ....	25
<b>Figura 3.</b> Ação das partículas magnéticas. ....	26
<b>Figura 4.</b> Mostra <i>Threshold</i> , curva de <i>melt</i> , temperatura <i>melting</i> e curva de amplificação obtidos na reação de PCR em tempo real com amostras da pesquisa. ....	35
<b>Figura 5.</b> Mostra eletroferograma com perfil genético completo obtido da amostra 6 extraída pelo método de extração por lise diferencial utilizando o kit <i>DNA IQ™ System</i> . ....	42
<b>Figura 6.</b> Mostra eletroferograma com perfil genético não analisável obtido da amostra 6 extraída pelo método de extração por lise diferencial orgânica. ....	43

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Comparação da quantificação por PCR em tempo real de DNA autossômico de fração espermática (FE) em amostras de crimes sexuais pela extração diferencial utilizando o kit *DNA IQ™ System* e pela extração por lise diferencial orgânica. .... 36
- Tabela 2.** Comparação da quantificação por PCR em tempo real de DNA de cromossomo Y em amostras de crimes sexuais pela extração diferencial utilizando o kit *DNA IQ™ System* e pela extração por lise diferencial orgânica. .... 38
- Tabela 3.** Médias de DNA autossômico e de cromossomo Y recuperados (ng/μL) pela extração diferencial utilizando o kit *DNA IQ™ System* e pela extração diferencial orgânica. .... 40

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Percentual de amostras com maior quantidade de DNA autossômico recuperado (ng/μL).....	38
<b>Gráfico 2.</b> Percentual de amostras com maior quantidade de DNA de cromossomo Y recuperado (ng/μL).....	40

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Protocolo de extração de DNA por lise diferencial utilizando o kit <i>DNA IQ™ System</i> (Promega) .....	55
--	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	A Genética Forense: um breve histórico .....	18
1.1.1	Poder de discriminação .....	19
1.1.2	Marcadores genéticos na ciência forense.....	20
1.2	O exame de DNA em crimes sexuais .....	22
1.3	Extração de DNA e crimes sexuais .....	23
1.4	Extração de DNA com partículas magnéticas .....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1	Objetivo Geral .....	27
2.2	Objetivos Específicos .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1	Aspectos éticos .....	28
3.2	Escolha das Amostras .....	28
3.3	Extração de DNA.....	29
3.3.1	Extração de DNA por lise diferencial usando o método orgânico.....	29
3.3.2	Extração de DNA por lise diferencial utilizando o kit <i>DNA IQ™ System</i> (Promega)	30
3.4	Quantificação do DNA extraído .....	32
3.5	Amplificação do DNA quantificado.....	32
3.6	Genotipagem do DNA amplificado.....	33
3.7	Análise estatística .....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>55</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A Genética Forense: um breve histórico

A genética forense utiliza conhecimentos de biologia molecular no estudo de materiais biológicos, com a finalidade de auxiliar à justiça na resolução de conflitos legais. Tem como objeto de estudo a molécula do ácido desoxirribonucleico conhecida como DNA (JOBBLING e GILL, 2004).

*DNA fingerprinting* ou tipagem de DNA como é mais conhecido, foi descrito primeiramente pelo geneticista inglês Alec Jeffreys, em 1985. O autor descobriu que determinadas regiões do DNA continham sequências repetidas várias vezes próximas umas das outras e eram altamente polimórficas, ou seja, o número de regiões repetidas presente no genoma humano diferenciava-se bastante entre indivíduos. Através da análise dessas regiões era possível identificar e diferenciar o material genético pertencente a indivíduos distintos (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985; CARVALHO, 2009).

A técnica foi aplicada pela primeira vez em um caso criminal para identificar o verdadeiro estuprador e assassino de duas jovens, Lynda Mann e Dawn Ashworth, nos anos de 1983 e 1986, respectivamente, em Narborough, condado de Leicester, Reino Unido. Este foi o primeiro caso descrito onde perfis genéticos foram aceitos em um tribunal como prova material de crime (JOBBLING e GILL, 2004).

Para Gill e Werrett (1987) o exame de DNA não apenas contribuiu para a identificação do verdadeiro autor dos crimes, Colin Pitchfork, como também para comprovar que a confissão de um indivíduo inicialmente detido e acusado dos crimes era falsa. Assim, o primeiro exame de DNA na esfera criminal serviu, ao mesmo tempo, para identificar um culpado e libertar um inocente. Era a inauguração de um novo tempo no emprego da biologia molecular, a identificação humana criminal.

Nos últimos anos, a aplicação da tecnologia do DNA nas análises de vestígios biológicos coletados em cenas de crime revolucionou a ciência forense (HENNEKENS et al, 2013), fornecendo dados eficientes e confiáveis que permitem individualizar uma pessoa, possibilitando sua identificação e criando uma relação de indivíduos com o fato delituoso. (KOCH e ANDRADE, 2008). Sua incorporação nos laboratórios criminais resultou, em escala crescente, na identificação de criminosos e na libertação de inocentes (BUTLER, 2012).

Rodriguez et al (2017) salientam que o teste do DNA é a ferramenta mais poderosa para fins de identificação humana na atualidade.

### **1.1.1 Poder de discriminação**

A variabilidade da molécula de DNA entre os diferentes indivíduos, exceto nos casos de gêmeos monozigóticos, faz com que cada ser humano apresente exclusividade do seu perfil genético. A igualdade e a imutabilidade deste perfil em todas as células do organismo ao longo da vida faz com que a análise de DNA seja propícia para identificação de vítimas e suspeitos na persecução penal, como também na resolução de casos cíveis (CORTE-REAL; VIEIRA, 2015).

Segundo Butler (2012), Budowle et al (2000) e Kelty et al (2018) com o domínio das técnicas de análise em DNA, os laboratórios de análise forense adquiriram a capacidade de identificar pessoas desaparecidas, cadáveres carbonizados ou em avançado estado de decomposição, identificar vítimas de grandes catástrofes; em locais de crime estabelecer vínculo entre suspeitos, entre um local de crime e outro e instrumento lesivo e vítima; confirmar abortos provocados, paternidade nos casos de gravidez consequente de estupro e incluir ou excluir suspeitos de crime sexual e de outros delitos.

Teoricamente, qualquer célula deixada por um indivíduo pode ser utilizada para conseguir seu perfil genético. Inúmeros tipos de materiais biológicos são passíveis de análise na genética forense. Marcadores genéticos podem ser obtidos de vestígios de quaisquer materiais biológicos, tais como sangue, espermatozoides, saliva, cabelo, ossos e dentes (BUTLER, 2012).

Segundo Jobim, Costa e Silva (2006) estes marcadores, herdados de cada progenitor, correspondem a sequências de DNA que variam de um indivíduo para outro, denominadas regiões polimórficas. Na prática forense, normalmente são analisados marcadores autossômicos, do cromossomo Y e mais recentemente os marcadores do cromossomo X. Além da análise do DNA extranuclear denominado DNA mitocondrial.

A presença de amostras biológicas é comum na rotina forense e está diretamente ligada a várias ocorrências criminais. Técnicas e procedimentos padrões de extração de DNA e posterior obtenção de perfis genéticos devem ser estabelecidos para que toda essa informação seja empregada a serviço da justiça. Segundo Wong e Mihalovich (2018) o sucesso da genética forense na resolução de crimes resultou em um aumento da demanda dos exames de DNA e os laboratórios têm de estar aptos para realizar cada vez mais análises de vestígios biológicos.

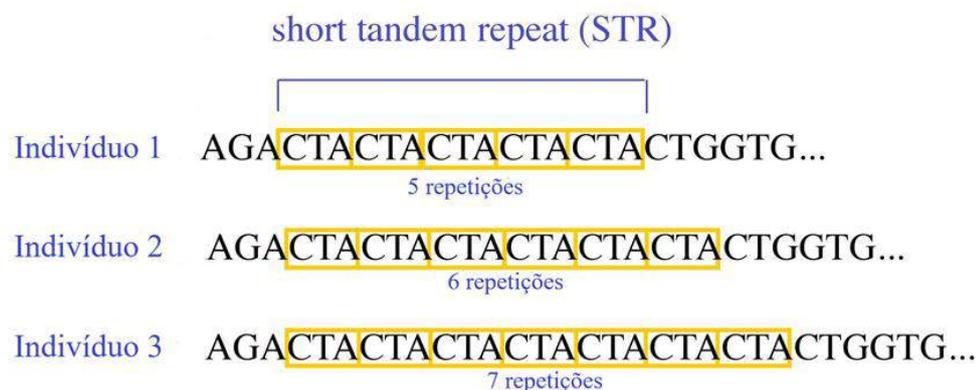
### 1.1.2 Marcadores genéticos na ciência forense

De acordo com Goes et al (2002) as repetições do DNA descobertas por Jeffreys ficaram conhecidas como VNTRs (*variable number of tandem repeats*) ou minissatélites. A metodologia utilizada para examinar as VNTRs foi chamada de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) porque envolvia o uso de uma enzima de restrição para cortar as regiões do DNA adjacentes às VNTRs. Porém a tipagem pela técnica RFLP requeria um DNA íntegro e em grande quantidade, tornando praticamente inviável a análise de amostras biológicas antigas, degradadas ou com quantidade mínima de DNA. O seu uso foi gradativamente descontinuado nos laboratórios forenses.

Atualmente o tipo de marcador molecular mais utilizado em identificação forense é o STR (do inglês, *short tandem repeat*) repetições curtas em série ou microsatélites. Esses marcadores são constituídos de pequenas sequências de DNA, variando de dois até seis pares de bases, que se repetem algumas vezes em sequência em uma determinada região do genoma (BUTLER, 2005).

Nessas regiões com alto grau de polimorfismo, indivíduos distintos apresentam diferentes números de cópias nas sequências repetitivas do material genético oferecendo um grande poder de discriminação entre indivíduos não relacionados (SILVA et al, 2012), como mostra a Figura 1.

**Figura 1.** Mostra a diferença de STRs autossômicos em indivíduos distintos.



**Fonte:** www.le.ac.uk - University of Leicester (com adaptação, 2018).

A análise de STRs apresenta as seguintes vantagens: a presença em todo o genoma, a possibilidade de amplificar simultaneamente vários *loci* ao mesmo tempo, o manuseio de

amostras com mistura, a amplificação de amostras com menos de 1ng de DNA e degradadas (SILVA et al, 2012), situações muito frequentes quando se trata de amostras forenses.

Segundo Butler (2005) os marcadores moleculares STRs autossômicos utilizados em laboratórios forenses e banco de perfis genéticos devem seguir, no mínimo, os treze marcadores escolhidos pelo *Federal Bureau of Investigation* - FBI para comporem o *Combined DNA Index System* (CODIS) : CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, TH01, TPOX e vWA e a amelogenina e estão disponíveis em kits comerciais com reagentes próprios para a amplificação simultânea de regiões polimórficas.

A análise desses fragmentos de DNA de interesse é realizada utilizando métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase ou PCR (*polimerase chain reaction*). A PCR foi descrita por Kary Mullis no final da década de 1980, prêmio Nobel de Química em 1993. (Butler, 2005).

Para Budowle, Bieber e Eisemberg (2005) e Butler (2012) a técnica de PCR consiste em um processo enzimático *in vitro* que aumenta exponencialmente a quantidade de pequenas e específicas sequências-alvo de DNA. Esta região específica é replicada exponencialmente até alcançar milhares de cópias de uma sequência particular a partir de pequenas quantidades (nanogramas ou picogramas) de DNA genômico, através de vários ciclos de aumento e diminuição de temperatura em um aparelho denominado termociclador, com uso de kits apropriados para análise forense.

A principal característica que faz da PCR uma técnica especial é proporcionar uma grande sensibilidade de detecção, boa especificidade, possibilidade de automação e uma velocidade de reação sem precedentes em procedimentos de biologia molecular (BUDOWLE et al, 2000; COTTON e FISHER, 2015). O uso da PCR é particularmente útil na análise de amostras forenses, geralmente compostas por DNA degradado ou em pequena quantidade, seja pela idade da amostra, exposição ambiental ou tratamento químico (BUDOWLE; BIEBER; EISEMBERG, 2005).

Segundo Fontana et al (2017) na atualidade a tecnologia padrão nas análises forenses para identificação genética pelo DNA incluem extração, quantificação, amplificação de STRs e levantamento de perfis genéticos utilizando sistemas de análise especialmente desenvolvidos. Com esta metodologia extremamente eficiente é possível a obtenção de um perfil genético com apenas alguns picogramas de DNA na amostra.

Os perfis de STRs obtidos de criminosos nos vestígios encontrados na cena de crime ou entre vestígios de diferentes cenas de crime podem ser comparados com os cadastrados nos bancos de dados de DNA. Inúmeros casos criminais já foram elucidados no mundo graças a essa ferramenta. Antes dos bancos de perfis genéticos não havia nenhuma informação ou

conhecimento de relação entre os criminosos e os vestígios coletados na cena do crime (GE et al, 2014; INTERPOL, 2015; MOTA e FINOTTI, 2018).

## 1.2 O exame de DNA em crimes sexuais

A Organização Mundial de Saúde (OMS), define a violência sexual como “qualquer ato sexual ou tentativa de obter ato sexual, investidas ou comentários sexuais indesejáveis, ou tráfico, ou qualquer outra forma, contra a sexualidade de uma pessoa usando coerção ou privação arbitrária de liberdade, seja na vida pública ou na vida privada” (WHO, 2018).

No Brasil, por meio de legislação específica, os atos violentos de natureza sexual são tipificados como crime. O Código Penal Brasileiro, nos capítulos que tratam dos crimes contra a liberdade sexual e dos crimes sexuais contra vulnerável, modificado pela Lei Nº 12.015, de 07 de agosto de 2009, define as diretrizes penais a cerca de estupro e estupro de vulnerável (BRASIL, 2009). Por força da Lei nº 8.072/90 (BRASIL, 1990), os crimes de estupro e de estupro de vulnerável foram previstos também no artigo 1º da Lei dos Crimes Hediondos, sendo este tipo penal insusceptível de anistia, graça e indulto.

Segundo o mais recente Anuário Nacional de Segurança Pública (LIMA, 2018), em 2017 foram registradas 60.018 ocorrências policiais concernentes a crimes sexuais, 389 destes foram registrados na Paraíba, conforme informações da Delegacia Geral de Polícia Civil do Estado da Paraíba, podendo não representar o quantitativo real dos crimes perpetrados em face da subnotificação. Valores semelhantes a taxa de homicídio brasileira, 63.880 homicídios no ano de 2017, que ocupa o sétimo lugar nas Américas (WHO, 2018).

Para Drezett et al (2011) nesse tipo de violência a vítima preferencial é a mulher, porém crianças, adolescentes e portadores de necessidades especiais, também sofrem agressões sexuais - definidas juridicamente com estupro de vulnerável. Estas agressões, na maioria dos casos, acontecem em ambiente familiar, por agressor conhecido da vítima ou membro familiar, de inteira confiança da vítima.

O Anuário Nacional de Segurança Pública mostra que 30% dos casos de estupro registrados contra crianças foram perpetrados por familiares próximos como pais, irmãos e padrastos e 46,1% das pessoas adultas foram vítimas de pessoas conhecidas (LIMA, 2018).

A identificação de autoria destes crimes de estupro é uma das questões mais importantes para solucionar ou direcionar uma investigação criminal. Para tanto a genética forense, através do exame de DNA, fornece ao sistema judiciário provas objetivas para a resolução de crimes,

trazendo cientificidade ao processo de determinação de autoria em delitos cujos autores deixam vestígios biológicos, como nos casos de crimes sexuais que comumente envolvem a liberação de fluidos biológicos do agressor durante o delito, determinando a inclusão ou exclusão de suspeitos de forma inquestionável (HENNEKENS et al, 2013; MAPES, KLOOSTERMAN e POOT, 2015; WILLIAMSON et al, 2018).

Em um processo de investigação de estupro as vítimas devem ser submetidas ao exame de corpo de delito pelos profissionais peritos médico-legais das instituições de perícia para exames sexológicos e coleta de material biológico para análises de DNA que possibilitem a identificação do agressor. Tais amostras incluem: pelos, cabelos, unhas, sangue, sêmen, fragmentos de pele (nas unhas da vítima) além de marcas de mordida e manchas de saliva. (FAÚNDES et al, 2006). No caso de fluidos corporais, a exemplo do sêmen, estes podem ser coletados diretamente das cavidades vaginal e/ou anal e oral da vítima. Todos estes materiais biológicos podem ser confrontados com o perfil genético do suspeito por meio do exame de DNA.

### **1.3 Extração de DNA e crimes sexuais**

Grande parte das amostras biológicas analisadas nos laboratórios forenses é oriunda de casos de crime sexual (WONG e MIHALOVICH, 2018). As amostras coletadas de vítimas de crimes sexuais geralmente contêm uma mistura de células nucleadas do homem agressor, predominantemente espermatozoides e outros tipos celulares a exemplo de células epiteliais de vítima do sexo feminino. A análise de DNA autossômico de material de crime sexual é um desafio para os analistas, já que a grande quantidade de material feminino na amostra pode impedir a detecção do DNA masculino presente na mistura de materiais genéticos (VUICHARD et al, 2011; LOUNSBURY et al, 2014). Este fato pode levar a uma exposição preferencial das células epiteliais femininas, o principal componente da mistura (HENNEKENS et al, 2013). O processo analítico envolvendo estas amostras merece especial atenção. Estudos experimentais relatam que a variação de protocolo pode influenciar no sucesso da obtenção do DNA extraído (YOSHIDA et al, 1995).

A técnica de extração pelo método orgânico (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico), em etapa única, é amplamente utilizada em casos forenses, mas, se não é precedida de uma técnica de separação de material genético espermático com extração por lise diferencial não é recomendável para tratar amostras de crime sexual, uma vez que, nestes casos, a maioria dos

resultados obtidos é uma mistura de perfis genéticos do agressor e da vítima (BUDOWLE et al, 2000; COTTON; FISHER, 2015; FONTANA et al, 2017).

Para análise de vestígios biológicos oriundos de crime sexual existem várias técnicas de separação de células espermáticas de outros tipos celulares. A automação de algumas etapas do exame (WONG e MIHALOVICH, 2018), a microdissecção a *laser* (LCM) (COSTA et al, 2017), a filtração por membrana (CHEN et al, 1988), microdispositivos que exploram as diferenças entre tamanho e forma das células (BIENVENUE et al, 2006) e a citometria de fluxo (SCHOELL et al, 1999) são exemplos de técnicas de separação celular.

A técnica de extração de DNA por lise diferencial orgânica ainda é a recomendável e foi proposta por Gill, Jeffreys e Werrett (1985) e modificada por Yoshida et al, em 1995. A lise diferencial é bastante utilizada também por impedir a amplificação preferencial do DNA da vítima, em virtude da sua supremacia em quantidade na amostra biológica (BUTLER, 2012; LEITE et al, 2013; COTTON; FISHER, 2015).

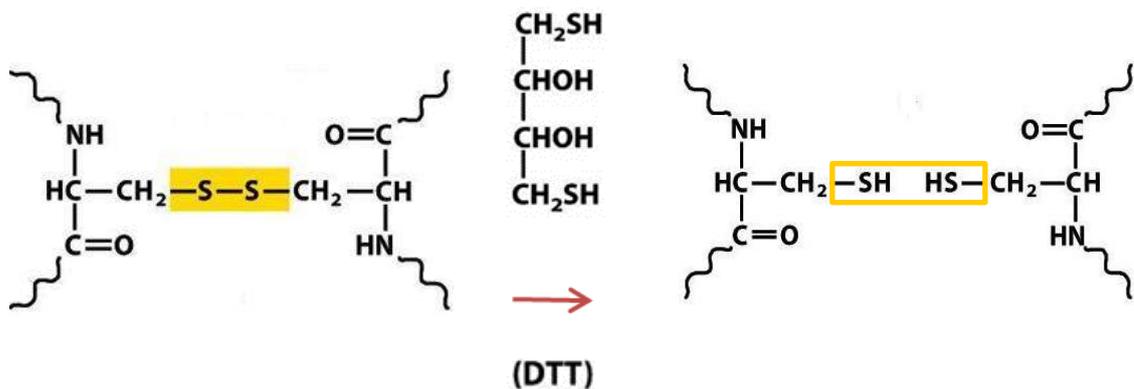
Este método se baseia na resistência diferenciada dos espermatozoides e das células epiteliais quando submetidas a determinadas substâncias químicas, sendo os espermatozoides bem mais resistentes que as células epiteliais. O método inclui uma etapa de lise celular leve, que permite a recuperação de uma fração de células epiteliais ricas em DNA feminino, seguida de outra etapa de lise de célula mais forte, utilizada para romper a membrana nuclear de espermatozoides e recuperar seu DNA na fração espermática. (GILL; JEFFREYS; WERRETT, 1985; JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985; YOSHIDA et al, 1995; BUDOWLE, 2000; VUICHARD et al, 2011; TIMKEN; KLEIN; BUONCRISTIANI, 2018).

A estrutura da cromatina do espermatozoide é reorganizada durante os estágios finais da espermatogênese quando histonas são substituídas por protaminas. Estas são proteínas básicas que se ligam ao DNA e contém uma grande quantidade de aminoácidos - arginina e cisteína - com muitas pontes dissulfeto inter e intramoleculares. Durante o transporte de espermatozoides no epidídimo, grupos tiol de protaminas -SH são oxidados em ligações sulfidrilas ou dissulfeto -SS- (sulfeto-sulfeto), proporcionando grande estabilidade ao núcleo de espermatozoides maduros, conferindo-os uma estrutura muito rígida e resistente a vários fatores mecânicos e químicos. Acredita-se que a rigidez do núcleo seja benéfica para a passagem mecânica da cabeça do espermatozoide através da zona pelúcida, muito espessa (YANAGIMACHI, 1994; HERNÁNDEZ-OCHOA et al 2006; IRANPOUR, 2014).

O Ditionotritol (DTT) quebra as pontes de dissulfeto de proteínas que compõem as membranas nucleares dos espermatozoides e forma dois grupos tiois (BUDOWLE, 2000) (figura 2). Segundo Gill, Jeffreys e Werrett (1985) e Walsh (2005), na etapa de lise da fração

espermática, a lise mais forte, é utilizada um tampão acrescido de DTT onde os espermatozoides sofrem lise de membrana nuclear. A separação das duas frações celulares permite que o processo de purificação dos dois grupos celulares siga separadamente e os perfis genéticos dos indivíduos femininos e masculinos podem ser mais facilmente identificados. A partir daí, o perfil de DNA de amostras coletadas da vítima é comparado ao perfil de DNA de um suspeito.

**Figura 2.** Quebra das pontes dissulfeto pelo DTT.



**Fonte:** Princípios da Bioquímica de Lehningher (com adaptação, 2018).

#### 1.4 Extração de DNA com partículas magnéticas

É um tipo de extração de DNA que se baseia na adição de partículas magnéticas a uma resina que se liga ao DNA em solução, e posteriormente, os complexos DNA - partículas magnéticas são capturados por um ímã. Diversas empresas comercializam kits para extração de DNA com o uso de partículas magnéticas. Estes kits podem ser utilizados tanto de maneira manual quanto automatizada (NAGY et al, 2005; PAJNIČ; POGORELC; BALAŽIC, 2010; VLAHOVIĆ e KUBAT, 2012).

Na visão de Davoren et al (2007) e Bogas et al (2011) vários fatores podem dificultar as análises em amostras forenses tais como degradação e presença de inibidores. Devido a alta especificidade da ligação do DNA com as esferas magnéticas cobertas pela sílica e a resina paramagnética é possível eliminar inibidores e recuperar DNA altamente purificado e identificar perfis genéticos em tais amostras.

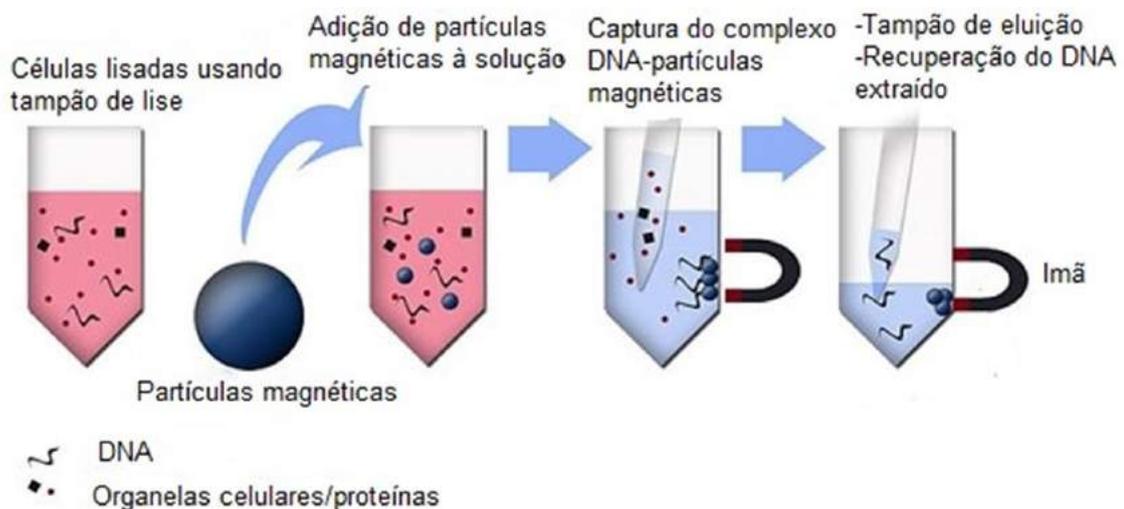
Os kits comerciais mais comuns para extração de DNA que utilizam partículas magnéticas são: *DNA-IQ™ System* (Promega) e *Prepfilers®* (Applied Biosystems), além de

sistemas robotizados como o *EZ1<sup>®</sup> Investigator* (Qiagen), todos validados para diversas amostras forenses (BOWDEN; FLEMING; HARBISON, 2011).

O kit *DNA IQ<sup>™</sup> System* foi idealizado como uma alternativa ao procedimento atual de extração com fenol-clorofórmio e microconcentração por filtração. O kit utiliza um tampão de lise próprio e esferas magnéticas revestidas de sílica para isolar o DNA purificado.

Segundo a empresa fabricante do kit, o DNA ligado à esfera magnética é imobilizado com a ajuda de um *rack* magnetizado que permite o seu isolamento em um único tubo. São realizadas etapas múltiplas de lavagem para remover detritos presentes da solução, sem prejuízo ao *pellet* de DNA, que é liberado no tampão de eluição por aquecimento. O *rack* magnetizado possui ímãs fortes embutidos para um rápido e eficiente sequestro e imobilização das esferas magnéticas com o DNA nelas capturado. A resina remove inibidores de PCR e contaminantes frequentemente encontrados em amostras forenses. A ilustração da figura 3 mostra este processo.

**Figura 3.** Ação das partículas magnéticas.



**Fonte:** azonano.com (com adaptação, 2018).

No presente estudo comparamos a eficiência de duas técnicas de extração de DNA, a técnica de extração diferencial orgânica e uma adaptação desta técnica utilizando o kit *DNA IQ<sup>™</sup> System* (Promega), para análises de vestígios biológicos coletados de crimes sexuais, que apresentassem dados quantitativos confiáveis para a identificação de criminosos. A análise de perfis genéticos no caso de crimes sexuais exige um resultado rápido, confiável, conclusivo e principalmente garantir a segurança da saúde do analista forense.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Utilizar o kit *DNA IQ™ System* na extração de DNA por lise diferencial em amostras coletadas de vítimas de crime sexual.

### 2.2 Objetivos Específicos

Verificar se é possível obter DNA espermático com a utilização do kit de extração *DNA IQ™ System* na extração com lise diferencial;

Realizar estudo comparativo entre as quantidades de DNA obtidas pelas duas técnicas analisando a quantidade de DNA autossômico e do cromossomo Y;

Realizar estudo comparativo com relação ao tempo de execução da extração pelo método diferencial orgânico e pelo método utilizando o kit *DNA IQ™ System*;

Analisar a possibilidade de eliminação dos solventes tóxicos da extração de DNA por lise diferencial orgânica utilizando o kit *DNA IQ™ System* na extração de DNA de amostras de crime sexual;

Propor um protocolo para a utilização do kit de extração *DNA IQ™ System* para obtenção da fração espermática e purificação de DNA na extração diferencial de amostras de crime sexual.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Atendendo às resoluções nº 196/96 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, conforme Parecer nº 2.628.808.

#### **3.2 Escolha das Amostras**

As vítimas de crime sexual quando encaminhadas aos Núcleos de Medicina e Odontologia Legal do Estado da Paraíba foram examinadas pelos peritos médicos legistas para procederem a exames sexológicos e de coleta de material biológico das cavidades, vaginal e/ou anal e oral, dependendo do caso, utilizando *swabs* estéreis.

As amostras foram coletadas por meio de solicitação oficial da autoridade policial (delegado de polícia civil) ou judiciária (juiz de direito/promotor de justiça) para comporem os respectivos inquéritos policiais ou processos judiciais. Após a coleta, o material biológico das vítimas foi encaminhado ao laboratório da Gerência Operacional de Análise em DNA para exames.

Neste estudo foram selecionadas, aleatoriamente, 50 amostras forenses, especificamente mucosa vaginal, coletadas de vítimas de crime sexual examinadas nos Núcleos de Medicina e Odontologia Legal do Estado da Paraíba, entre os anos de 2015 e 2017. A pesquisa foi realizada no Laboratório da Gerência Operacional de Análises em DNA onde as amostras se encontravam custodiadas, previamente acondicionadas em microtubos estéreis de 2 mL e refrigeradas à temperatura de -4°C. Tais amostras foram codificadas por meio de código alfanumérico para garantir o direito à privacidade dos doadores, preservando suas identidades.

Os equipamentos de proteção individual como touca, máscara, luvas e jaleco foram utilizados para a manipulação das amostras.

Após os procedimentos de coleta os vestígios biológicos relacionados a eventos criminais foram submetidos a uma sequência de etapas técnicas até a obtenção do resultado final, um perfil genético da amostra.

### 3.3 Extração de DNA

As amostras foram alíquotadas em conjuntos duplicados - um conjunto para extração de DNA com lise diferencial pelo método orgânico e um conjunto para a extração de DNA com lise diferencial utilizando kit de extração *DNA IQ™ System*. Duas alíquotas equivalentes de cada amostra (*swabs* vaginais) foram depositadas em tubos de 2,0 mL. As extrações foram executadas em conjuntos de 10 amostras por evento.

Foram realizadas extrações como controles negativos para as frações espermáticas (FE) e frações não espermáticas (FNE) nas duas metodologias testadas.

As amostras não foram extraídas em duplicata, para cada técnica, em virtude da quantidade exígua do material e da obrigatoriedade de armazenamento de parte do material analisado para possível exame contraprova, conforme determina o Código de Processo Penal Brasileiro.

#### 3.3.1 Extração de DNA por lise diferencial usando o método orgânico

As amostras foram submetidas ao protocolo de extração de DNA por lise diferencial pelo método orgânico para separação do DNA nuclear de espermatozoides e de células epiteliais (Gill, Jeffreys e Werrett, 1985), adaptado por Yoshida em 1999, além de algumas alterações livres estabelecidas pelos profissionais dos laboratórios forenses, conforme as etapas abaixo descritas:

1. Nos tubos contendo as alíquotas das amostras previamente selecionadas foi adicionado tampão de extração de fração não espermática (FNE) [400 µL de Tris/EDTA/NaCl (10 mM Tris-HCl/1mM EDTA/100 mM NaCl; pH 8,0); 25µL de Sarkosil 20%; 75 µL de água ultrapura; 7,5 µL de Proteinase K 20 mg/mL]. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 5 horas;

2. Após esse tempo os fragmentos de *swab* foram descartados e as amostras foram centrifugadas a 12.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo estéril, sendo identificado como FNE e guardado na geladeira até as etapas subsequentes envolvendo a FNE.

3. No precipitado do microtubo, fração espermática (FE), adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem de esperma (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 50mM NaCl; SDS 2%; pH 7,5), com

centrifugação a 12.000 RPM por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante. Este processo de lavagem foi realizado três vezes.

4. Nos microtubos contendo a fração espermática (FE) foram adicionados tampão de extração (150 µL Tris/EDTA/NaCl; 50 µL Sarkosil 20%; 150µL de água ultrapura; 2 µL de Proteinase K 20 mg/mL; 7µL de DTT 1mol/L). Os microtubos foram submetidos à homogeneização por 10 segundos e incubados a 37°C por 12 horas ou *overnight*;

5. Foram adicionados aos dois microtubos contendo a FE e a FNE 400 µL de clorofane (fenol: clorofórmio:álcool isoamílico 25:24:1). Os microtubos foram centrifugados a 12.000 RPM por 5 minutos. A fase aquosa (superior) foi transferida para microtubos estéreis contendo dispositivo de ultrapurificação para DNA forense com membrana de celulose regenerada tipo Microcon® e submetidos à centrifugação por 10 minutos a 8.000 RPM. Foi adicionado cerca de 300 µL de água ultrapura à unidade de purificação e novamente centrifugada nas mesmas condições do passo anterior até a filtração de todo o volume. O filtrado foi descartado.

6. Transferiu-se a unidade concentradora para outro tubo estéril, adicionando 50 µL de água ultrapura nas frações FNE e FE, pipetando várias vezes e tendo o cuidado para não romper a membrana de celulose regenerada tipo Microcon®. Inverteu-se a posição da unidade concentradora em novos tubos e procedeu-se à recuperação do DNA por centrifugação, 13.000 RPM por 2 minutos. Ao final do processo obtivemos 100 produtos de extração, 50 FE e 50 FNE.

### **3.3.2 Extração de DNA por lise diferencial utilizando o kit *DNA IQ™ System* (Promega)**

A adaptação da metodologia de extração por lise diferencial proposta no presente estudo foi realizada com o kit comercial de extração *DNA IQ™ System* (Promega), seguindo o manual do fabricante, para a lise da fração espermática e posterior purificação do DNA nuclear de espermatozoides e de células epiteliais, conforme as etapas a seguir:

1. A primeira etapa de lise mais branda seguiu as mesmas etapas da extração de DNA por lise diferencial orgânica. Assim, nos tubos contendo as alíquotas das amostras selecionadas foi adicionado tampão de extração da fração não espermática (FNE), conforme descrito do método padrão (etapas 1 e 2 do item 3.3.1);

2. Foi adicionado igual volume de etanol absoluto aos tubos contendo a fração não espermática (FNE). Os tubos foram centrifugados a 9600 RPM por 7 minutos e o sobrenadante

descartado, restando um precipitado contendo a FNE. Os tubos foram guardados em geladeira até as etapas posteriores envolvendo a FNE.

3. Ao precipitado do microtubo, fração espermática (FE), adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem de esperma (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 50mM NaCl; SDS 2%; pH 7,5), com centrifugação a 12.000 RPM por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante. Este processo de lavagem foi realizado três vezes, descartando o sobrenadante a cada centrifugação e preservando o *pellet* contendo a fração FE.

4. Foram adicionados 100 µL de tampão de lise do kit *DNA IQ™ System* e 1 µL de DTT aos microtubos contendo o *pellet* com a FE. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 10 segundos e depois incubadas em bloco seco a 95°C por 30 minutos.

5. Após esse período, as amostras foram retiradas da incubação e nos tubos contendo a fração não espermática (FNE) anteriormente precipitada com etanol absoluto foram adicionados 100 µL de tampão de lise e 1 µL de DTT.

6. Após agitação em vortex por 5 segundos a velocidade máxima 3,5 µL da suspensão de resina magnética presente no kit foram acrescentados aos tubos contendo as frações FE e FNE. As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, misturando-as de uma a três vezes por inversão do tubo.

7. Os tubos com a suspensão obtida foram agitados em vortex por 5 segundos em alta velocidade e imediatamente colocados na estante magnética. O sobrenadante foi retirado tomando o cuidado para não mover a resina com o DNA na parede tubo.

8. Em seguida procedeu-se à adição de 100µL do tampão de lavagem 1X, remoção do tubo da estante magnética e agitação dos tubos por 5 segundos a velocidade máxima em vortex. Os tubos foram novamente colocados na estante magnética para remoção do sobrenadante. Este procedimento de lavagem foi realizado de três vezes. Todo o sobrenadante foi removido do tubo na última lavagem.

9. Com as tampas dos tubos abertas a resina ficou secando na estante magnética durante 5 minutos. Após este período foram adicionados 50 µL do tampão de eluição. Com as tampas fechadas os tubos foram agitados por 5 segundos em vortex a velocidade máxima e incubados à 65°C durante 5 minutos.

10. Em seguida, os tubos foram retirados do aquecimento, agitados por 5 segundos em vortex a velocidade máxima e colocados na estante magnética, imediatamente. O sobrenadante contendo o DNA extraído foi transferido para recipiente de escolha.

Resultaram ao final do processo 100 produtos de extração, das quais 50 foram de FE e outras 50 de FNE.

Ao término dos dois métodos de extração foram obtidos 200 produtos de extração, sendo 50 frações não espermáticas (FNE) e 50 frações espermáticas (FE), resultantes da lise diferencial usando o método orgânico e igual número de amostras - 50 frações FE e 50 FNE - com a metodologia utilizando o kit *DNA IQ™ System* (Promega).

### 3.4 Quantificação do DNA extraído

As 200 amostras foram quantificadas por PCR em tempo real com o kit *Plexor® HY* (Promega) que determinou a concentração de DNA humano total e DNA humano masculino simultaneamente em uma reação e de um controle de PCR interno (*internal PCR control*) – IPC, além da capacidade de detecção à partir de aproximadamente 3.2 pg/μL até 50 ng/μl de DNA ([www.promega.com](http://www.promega.com)). As análises foram realizadas na plataforma *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem)* e para análise dos resultados utilizou-se o programa *Plexor® Analysis Software v1.4*.

Foi realizada uma diluição seriada nas concentrações de 50ng/μL, 10ng/μL, 2ng/μL, 0,4ng/μL, 0,8ng/μL, 0,016ng/μL e 0,0032ng/μL para a construção da curva padrão, utilizando uma amostra de DNA controle genômico humano de concentração conhecida (*Plexor HY Male Genomic DNA Standard, 50ng/μL*), para inferir a quantidade de DNA amplificado a partir da fluorescência produzida pela reação ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

Essas diluições foram submetidas ao mesmo sistema de amplificação das amostras a serem quantificadas. As proporções dos reagentes utilizados na reação de quantificação, conforme o fabricante, são as seguintes: 10 μL de *Plexor HY 2X Master Mix*, 1,0 μL de *Plexor HY 20X Primer mix*, 7,0 μL de Água estéril e 2,0 μL de material extraído.

Na plataforma *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)* empregou-se as seguintes condições de temperatura e ciclos para PCR em tempo real: 95° C por 2 minutos; (95°C - 10 segundos; 60°C - 35 segundos, em 38 ciclos); temperatura da curva de *melt* – predefinições pelo programa: Funções de dissociação.

### 3.5 Amplificação do DNA quantificado

De acordo com os resultados da quantificação, uma amostragem dos produtos de DNA extraído da fração espermática (FE) e da fração não espermática (FNE) pelas duas técnicas foi submetida a um processo de normalização por meio de diluição ou concentração do material

genético extraído, objetivando uma concentração final próxima daquela recomendada pelo fabricante, entre 0,25 e 0,5 ng/μL.

As amostras foram amplificadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o emprego do sistema multiplex *PowerPlex® Fusion* (Promega) em termociclador *C1000 Touch Thermal Cycler* (BioRad). O kit é composto por 22 marcadores do tipo STR autossômicos (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D22S1045, Penta E e Penta D), um marcador do cromossomo Y (DYS391) e Amelogenina que determina o gênero sexual.

No mix da PCR foram utilizados 5 μL de *Master Mix PowerPlex® Fusion*, 5 μL Mix de *Primers PowerPlex® Fusion* e 15 μL divididos entre DNA extraído e água ultra pura, para um volume final de 25 μL, seguindo o protocolo da empresa fabricante.

No termociclador *C1000 Touch Thermal Cycler* (BioRad) empregou-se as seguintes condições de PCR para amplificação: 96°C - 2 minutos; (94°C - 10 segundos; 59°C - 1 minuto; 72°C - 30 segundos, em 30 ciclos); 60°C - 10 minutos; 4°C até a remoção dos tubos do termociclador.

### **3.6 Genotipagem do DNA amplificado**

Os produtos de amplificação do universo amostral foram submetidos à genotipagem por eletroforese capilar em sequenciador genético ABI PRISM 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) com oito capilares de 36 centímetros, seguindo as especificações do equipamento ([www.thermofischer.com](http://www.thermofischer.com)) e o manual do sistema multiplex *PowerPlex® Fusion* (Promega).

### **3.7 Análise estatística**

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o *software GraphPad Prism®* v.6.0. e o teste de Wilcoxon não paramétrico pareado.

## 4 RESULTADOS

As extrações de DNA por lise diferencial foram realizadas pela técnica orgânica e com o kit *DNA IQ™ System* que forneceram 200 produtos de extração, sendo 100 frações espermáticas possivelmente com DNA masculino do agressor e 100 frações não espermáticas provavelmente com material feminino.

Todas as amostras foram quantificadas por meio de PCR em tempo real utilizando o kit comercial *Plexor® HY* (Promega) que determinou a concentração de DNA humano autossômico e DNA humano masculino simultaneamente em uma reação.

Os 100 produtos de extração de frações não espermáticas (FNE) foram submetidos a quantificação, porém os dados não foram aqui mostrados pois não era o objetivo do presente trabalho. Uma vez que as amostras foram coletadas de vítimas mulheres é plausível que as frações FNE contenham material do sexo feminino.

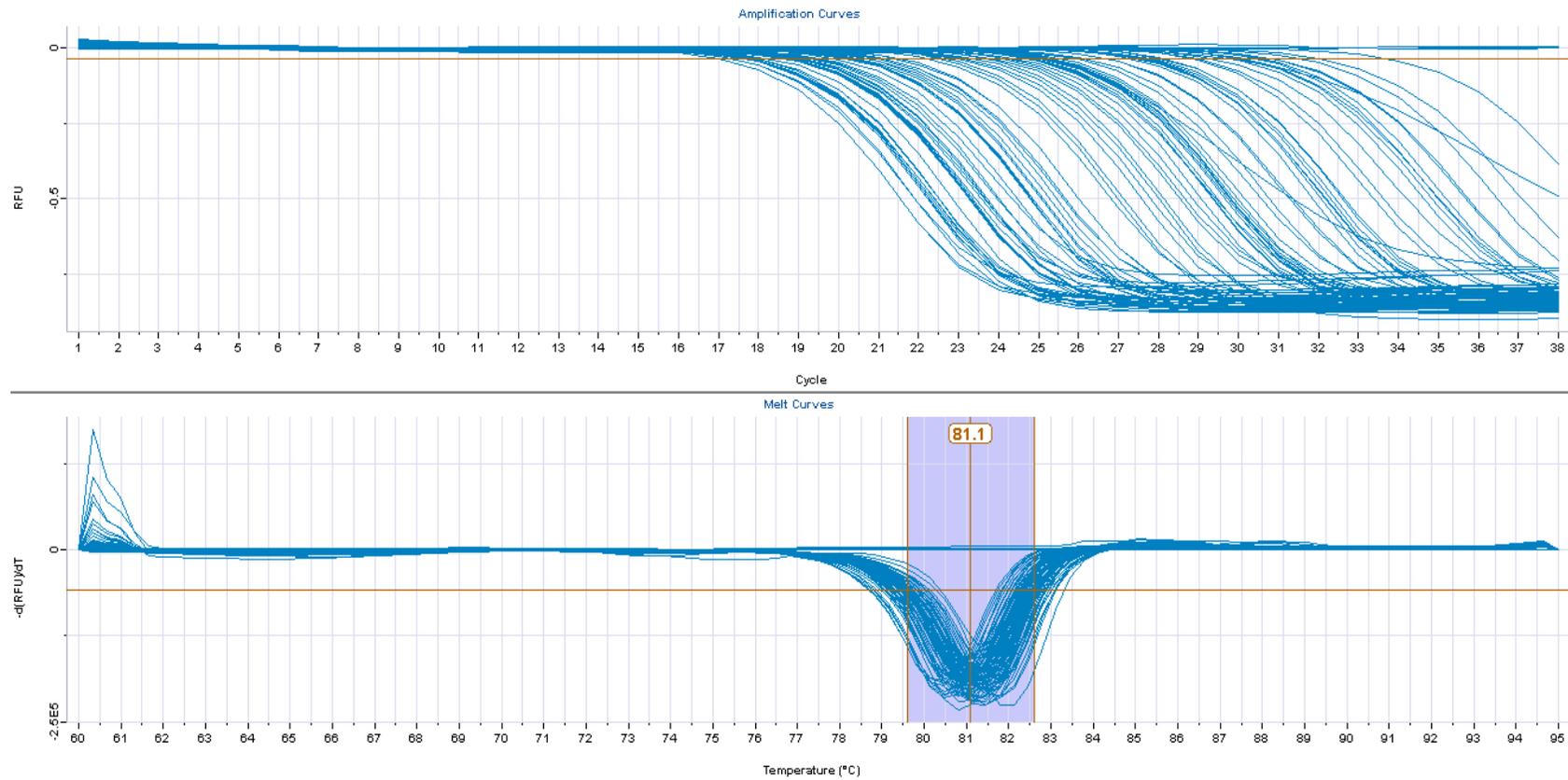
Os resultados das temperaturas de *melting* da quantificação que verificaram se os componentes do kit estavam funcionando corretamente estão representados na figura 4. A temperatura de *melting* corresponde àquela na qual aproximadamente 50% das moléculas de DNA foram desnaturadas e o sinal fluorescente alterado. A curva de *melt* é formada pelas médias de temperatura *melting* e a esperada para os fluoróforos do kit utilizado são em torno de 79-83°C, dependendo do equipamento ([www.promega.com](http://www.promega.com)). A média de temperatura de *melting* registrada neste trabalho foi 81,1°C (Figura 4).

O ciclo de *Threshold* ou Ct que determinou o número de ciclos necessários para que o sinal fluorescente atingisse o limiar de detecção na PCR quantitativa está representado (linha horizontal laranja) na figura 4. A PCR quantitativa é norteadada pela existência de uma relação matemática exata inversa entre o Ct e o número inicial de cópias de DNA molde, ou seja, quanto mais DNA mais rapidamente se atinge o Ct ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

Os resultados da quantificação foram analisados quanto a presença de inibidores de PCR por meio do controle interno de PCR em tempo real - IPC presente no sistema de quantificação utilizado, não evidenciando inibidores nas amostras.

Os resultados dos controles negativos de extração das duas metodologias estudadas no presente trabalho não registraram presença de DNA quantificado numericamente significante.

**Figura 4.** Mostra *Threshold*, curva de *melt*, temperatura *melting* e curva de amplificação obtidos na reação de PCR em tempo real com amostras da pesquisa.



**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

Os resultados dos cálculos estatísticos utilizando o software *GraphPad Prism*<sup>®</sup> v.6.0. mostraram, com base na construção de histogramas, que os dados de quantificação das amostras extraídas não possuíam uma distribuição normal. Por esta razão os cálculos foram realizados utilizando o teste de Wilcoxon não paramétrico pareado de comparação de médias.

O teste de Wilcoxon mostrou que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com o *p*-valor < 0,0001 para as quantificações de DNA autossômico e do cromossomo Y.

A quantidade de DNA autossômico recuperado nas frações espermáticas (FE) pelas duas metodologias de extração pode ser evidenciada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Comparação da quantificação por PCR em tempo real de DNA autossômico de fração espermática (FE) em amostras de crimes sexuais pela extração diferencial utilizando o kit *DNA IQ*<sup>™</sup> *System* e pela extração por lise diferencial orgânica.

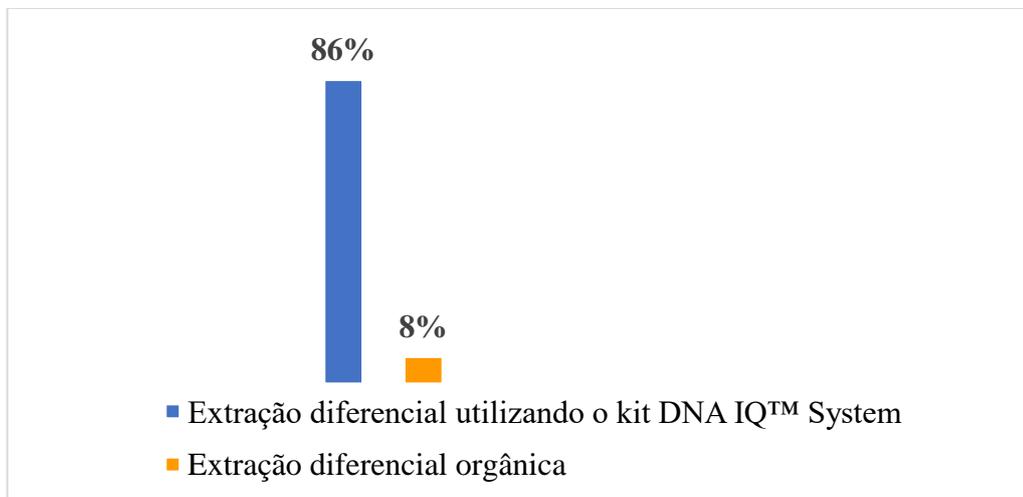
Nº	Extração por lise diferencial utilizando o kit <i>DNA IQ</i> <sup>™</sup> <i>System</i> (DNA autossômico FE - ng/μL)	Extração por lise diferencial orgânica (DNA autossômico FE - ng/μL)
1	0,20872527	0,008416271
2	0,15489584	N/A
3	0,55872749	N/A
4	2,77132886	0,006737023
5	0,01089181	0,003500521
6	0,68562233	0,000954303
7	0,06236615	N/A
8	0,06005359	0,000302892
9	0,4897396	0,000508796
10	0,10054299	0,059847725
11	0,07796099	0,012503274
12	0,08759345	0,109334351
13	0,44160323	0,020913751
14	0,48691499	0,009220886
15	0,15428483	0,04039753
16	5,70965983	0,046193857
17	4,88905134	0,009871188
18	0,43335117	0,000954303
19	0,40643239	0,089156564
20	0,00670134	0,008730862
21	0,37537297	0,492694
22	0,7547459	0,152667931
23	0,03481515	0,031448299
24	0,01034425	0,01199125

Nº	Extração por lise diferencial utilizando o kit <i>DNA IQ™ System</i> (DNA autossômico FE - ng/µL)	Extração por lise diferencial orgânica (DNA autossômico FE - ng/µL)
25	0,01701053	0,025684511
26	1,75761396	0,511512614
27	18,7301235	5,597293236
28	0,96087856	0,66019053
29	21,5793953	0,395371092
30	0,02724506	0,018798625
31	0,03759989	0,006635161
32	0,82428327	0,009589515
33	1,09333899	0,424183295
34	7,42339547	1,067421573
35	1,07250378	0,002517314
36	0,37178038	0,090722983
37	0,30315275	0,012682497
38	0,10525797	0,003832699
39	0,11510261	0,032061749
40	0,00842396	0,003883944
41	7,67353995	0,090518404
42	3,73496363	0,014491901
43	15,793641	0,069265497
44	0,08610388	0,03541912
45	0,0762391	0,005607329
46	0,06606681	0,006296528
47	0,3048695	0,081976746
48	0,12269926	0,000681305
49	3,84977112	0,020062268
50	0,05814504	0,000778193

**Nota:** N/A = Não analisável

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

Em 86% das amostras testadas a quantidade de DNA autossômico masculino recuperado (ng/µL) foi maior pela metodologia com o kit *DNA IQ™ System* do que pelo método orgânico. Em apenas 8% das mesmas amostras foi recuperada uma quantidade maior de DNA (ng/µL) pela técnica orgânica (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Percentual de amostras com maior quantidade de DNA autossômico recuperado (ng/ $\mu$ L).

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

A quantidade de DNA de cromossomo Y amplificado nas frações espermáticas (FE) pelas duas metodologias de extração pode ser observada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Comparação da quantificação por PCR em tempo real de DNA de cromossomo Y em amostras de crimes sexuais pela extração diferencial utilizando o kit *DNA IQ™ System* e pela extração por lise diferencial orgânica.

Nº	Extração por lise diferencial utilizando o kit <i>DNA IQ™ System</i> (Cromossomo Y - ng/ $\mu$ L)	Extração por lise diferencial orgânica (Cromossomo Y - ng/ $\mu$ L)
1	0,1485372	0,007034
2	0,1104075	N/A
3	0,2405545	N/A
4	1,0163423	0,002238
5	0,0051929	0,00135
6	0,4259762	0,000506
7	0,0465839	N/A
8	0,0109373	N/A
9	0,1881533	N/A
10	0,0258894	0,021842
11	0,0191649	0,008362
12	0,006718	0,011561
13	0,3085084	0,005523
14	0,3439615	0,001227
15	0,1474806	0,020165
16	5,544283	0,01488

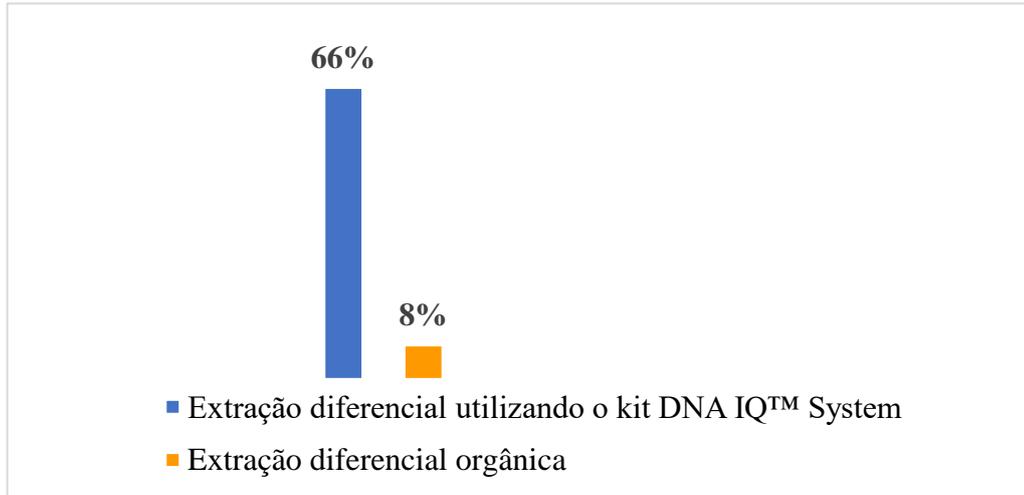
Nº	Extração por lise diferencial utilizando o kit <i>DNA IQ™ System</i> (Cromossomo Y - ng/µL)	Extração por lise diferencial orgânica (Cromossomo Y - ng/µL)
17	3,7431798	0,007472
18	0,2066303	0,000506
19	0,5472903	0,044128
20	N/A	0,000333
21	0,3143677	0,728187
22	0,0012739	0,010865
23	0,0116882	0,029063
24	N/A	N/A
25	0,0038448	0,007845
26	1,6171833	0,446814
27	23,592382	5,717962
28	1,8154046	1,281936
29	23,766589	0,342098
30	0,0143383	0,005081
31	0,0120358	0,006033
32	1,3885865	0,006201
33	0,8183095	0,283248
34	7,2925165	0,725203
35	0,8682575	N/A
36	0,2892085	0,049786
37	0,474904	0,007002
38	0,0393478	0,001826
39	0,1222944	0,017889
40	0,0005125	N/A
41	10,443795	0,080988
42	0,0156511	0,00978
43	26,569895	0,056223
44	0,041489	0,036448
45	0,0417559	0,002316
46	0,0016128	N/A
47	0,2694812	0,060226
48	0,0418861	N/A
49	3,4944771	0,010338
50	0,0195502	N/A

**Nota:** N/A = Não analisável

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

Em 66 % das amostras testadas a quantidade de DNA de cromossomo Y recuperado (ng/µL) foi maior pela metodologia de extração utilizando o kit *DNA IQ™ System* do que pela extração diferencial orgânica. A recuperação de DNA de cromossomo Y foi maior em 8% das mesmas amostras quando extraídas pelo método diferencial orgânico, conforme o Gráfico 2.

**Gráfico 2.** Percentual de amostras com maior quantidade de DNA de cromossomo Y recuperado (ng/ $\mu$ L).



**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

As médias obtidas pelo teste de Wilcoxon revelaram uma recuperação de cerca de 10 vezes mais DNA autossômico masculino e DNA de cromossomo Y (ng/ $\mu$ L) pela metodologia utilizando o kit *DNA IQ™ System* quando comparadas com o método diferencial orgânico, conforme mostra a tabela 3.

**Tabela 3.** Médias de DNA autossômico e de cromossomo Y recuperados (ng/ $\mu$ L) pela extração diferencial utilizando o kit *DNA IQ™ System* e pela extração diferencial orgânica.

	Extração diferencial utilizando o kit <i>DNA IQ™ System</i>		Extração diferencial orgânica	
	DNA autossômico (ng/ $\mu$ L)	DNA de cromossomo Y (ng/ $\mu$ L)	DNA autossômico (ng/ $\mu$ L)	DNA de cromossomo Y (ng/ $\mu$ L)
<b>Médias</b>	<b>2,1033</b>	<b>2,3293</b>	<b>0,2060</b>	<b>0,2014</b>

**Fonte:** Dados da pesquisa (2018).

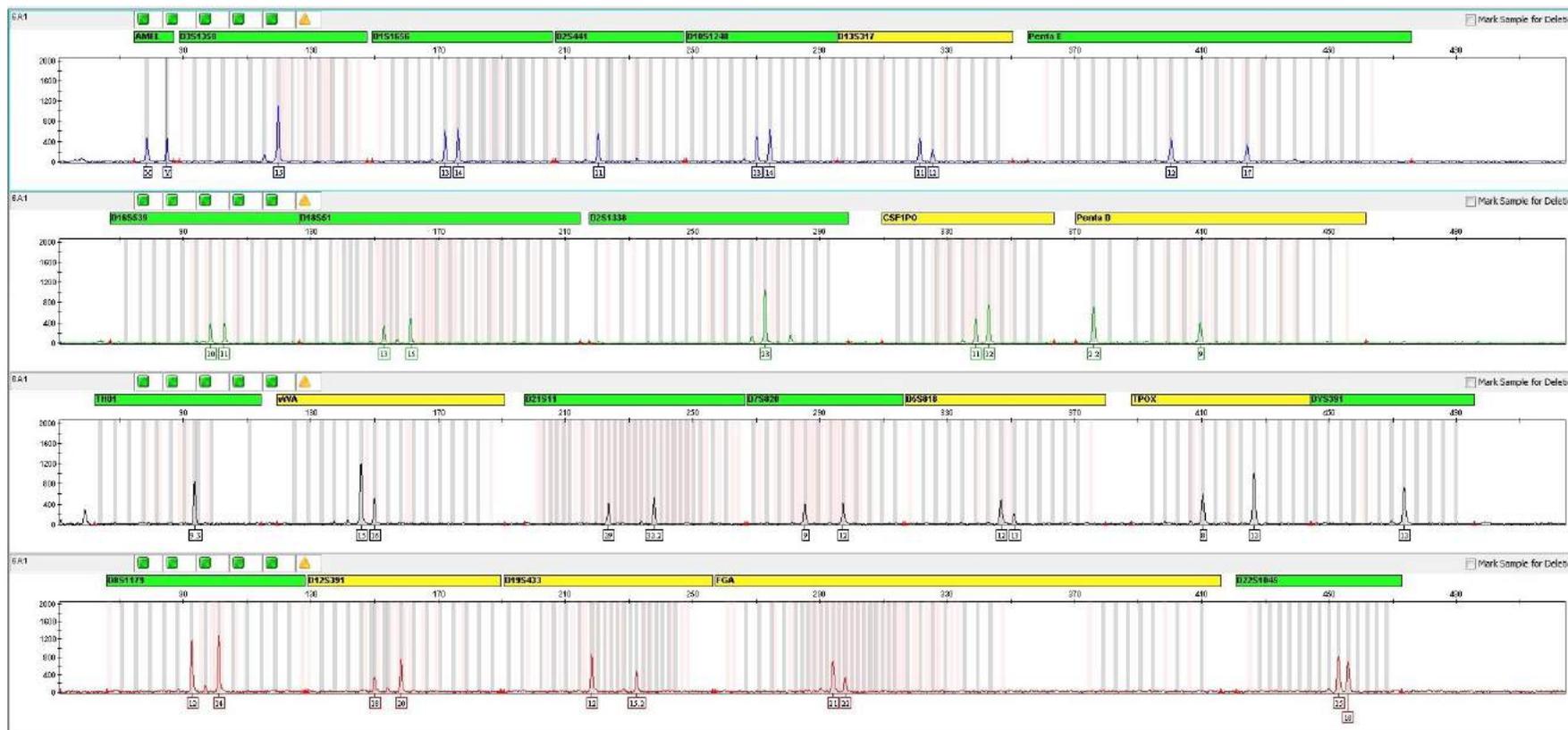
A figura 5 apresenta um perfil genético completo obtido da amostra 6 utilizando a metodologia com o kit *DNA IQ™ System* e a figura 6 mostra um eletroferograma da mesma amostra submetida à extração por lise diferencial orgânica onde não foi obtido perfil genético em condições de análise e confronto com outro perfil.

O tempo de processamento da extração nas duas metodologias foi avaliado desde o início da incubação da amostra com o tampão de lise até o DNA extraído ser ressuspensão. Para cada grupo de 10 amostras o tempo gasto de extração utilizando o kit *DNA IQ™ System* foi de

5 horas aproximadamente, enquanto que para o procedimento de extração pelo método orgânico foi em torno de 24 horas.

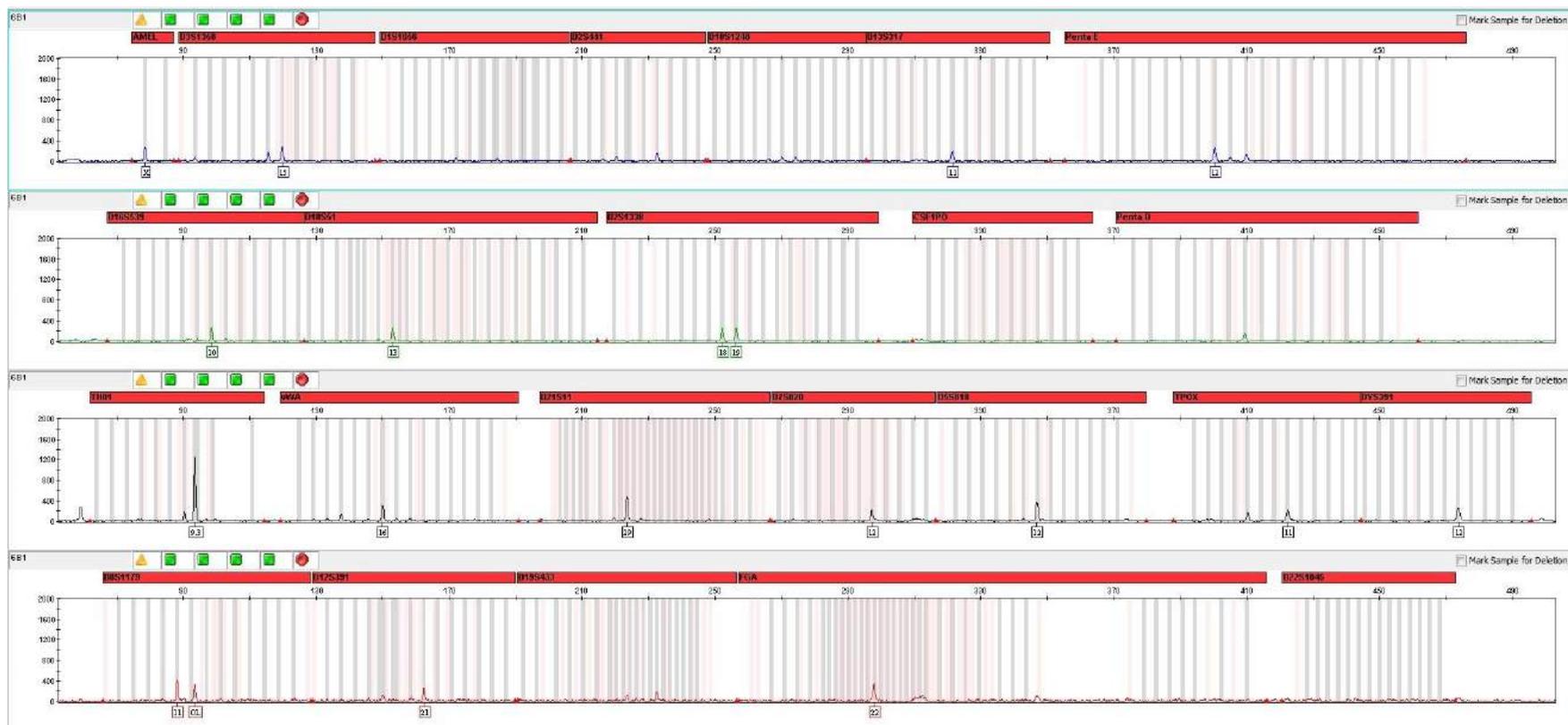
A substituição dos solventes orgânicos tóxicos - fenol e clorofórmio - pelo kit *DNA IQ™ System* com partículas magnéticas forneceu resultados satisfatórios da quantificação de DNA por PCR em tempo real em relação a quantidade e qualidade de DNA autossômico masculino e do cromossomo Y recuperados.

**Figura 5.** Mostra eletroferograma com perfil genético completo obtido da amostra 6 extraída pelo método de extração por lise diferencial utilizando o kit *DNA IQ™ System*.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

**Figura 6.** Mostra eletroferograma com perfil genético não analisável obtido da amostra 6 extraída pelo método de extração por lise diferencial orgânica.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

## 5 DISCUSSÃO

A análise molecular de amostras de DNA tem sido muito utilizada com o objetivo de ajudar a solucionar investigações criminais, entre elas os crimes sexuais, e passou a ser rotina no contexto pericial em vários Estados do Brasil.

A otimização de técnicas para obtenção de DNA a partir de vestígios biológicos é de inegável importância para aumentar a quantidade de perfis genéticos recuperados em locais de crime, determinar autoria de infrações penais e inserção de perfis em banco de dados. A obtenção de perfis genéticos masculinos nos casos de crimes sexuais proporciona a materialidade do fato criminoso com uma prova científica e irrefutável para que a justiça possa estabelecer a culpa de agressores ou excluir suspeitos inocentes.

Para Timken, Klein e Buoncristiani (2018) a extração de DNA por lise diferencial permite separar DNA masculino do feminino, com suas frações espermáticas (FE) e não espermáticas (FNE). É extremamente útil quando analisadas secreções vaginais e/ou anais onde há uma maior probabilidade de amplificação preferencial de material feminino em detrimento ao masculino. Esta análise aumenta a habilidade dos laboratórios forenses em discriminar indivíduos do sexo masculino, ratificando a importância da análise de marcadores genéticos nos crimes sexuais.

Não obstante se constituir num método eficaz para a análise de vestígio biológico oriundo de crime sexual, a técnica de extração orgânica de DNA por lise diferencial utiliza a mistura de fenol-clorofórmio (NG et al, 2017). Segundo Rodriguez et al (2017) esta mistura de solventes orgânicos expõe os analistas a substâncias químicas tóxicas extremamente nocivas à saúde humana, gera resíduos orgânicos tóxicos e requer aumento das precauções de segurança no laboratório.

Segundo a classificação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 14725-2), o fenol apresenta grau de toxicidade aguda, categoria 3. De acordo com a Norma Regulamentadora 15, que trata das Atividades e Operações Insalubres (BRASIL, 2009), o fenol e o clorofórmio apresentam grau máximo de insalubridade. Portanto, o intuito dos pesquisadores deve ser no sentido de atenuar ou eliminar essas desvantagens do método de análise, evitando ao máximo o uso de tais substâncias.

Para Mandrikar, Krenke e Tereba (2001) as principais vantagens da extração por meio do *kit DNA IQ™ System* são o fato de não utilizar solventes orgânicos prejudiciais à saúde do operador a exemplo do fenol e do clorofórmio, a possibilidade de automação, a resistência a inibidores de PCR, eliminação de múltiplos passos de centrifugação utilizados em alguns

procedimentos de purificação de DNA e execução simples (WANG e MC CORD, 2011). Basicamente esta extração consiste em quatro passos: extração ou lise da amostra, captura do DNA usando a resina magnética, lavagem da resina e eluição do DNA. ([www.promeqa.com](http://www.promeqa.com)). Os dados obtidos no presente estudo mostraram que é possível eliminar os inconvenientes tóxicos da metodologia de lise diferencial orgânica, substituindo o fenol e o clorofórmio pelo protocolo adaptado utilizando kit de extração *DNA IQ™ System* de uso rotineiro no laboratório de DNA do Instituto de Polícia Científica do Estado da Paraíba.

A técnica de extração orgânica também demanda muito trabalho sendo bastante morosa em decorrência do tempo de incubação necessário nas duas etapas de lise envolvidas no processo, conforme argumentam Katilius et al (2018) e Wong e Mihalovich (2018). Na primeira etapa são necessárias 5 horas, em média, para a lise das células não espermáticas. Na segunda etapa, para a lise das células espermáticas, o tratamento é mais rigoroso com tempo de incubação de 12 h, em média, ou *overnight*.

O fluxo de trabalho proposto nesta pesquisa reduziu significativamente o tempo de processamento de extração de DNA por lise diferencial orgânica de quase 24 horas para apenas 5 horas, utilizando o kit *DNA IQ™ System*, uma redução de cerca de 79 % no tempo de extração em relação à metodologia orgânica. Essa diminuição do tempo proporcionou maior celeridade à conclusão das análises laboratoriais e liberação mais rápida de resultados de exames de DNA como provas de agressão sexual, proporcionando um incremento na contribuição da genética forense nas investigações criminais e processos judiciais com a identificação e apreensão de agressores sexuais.

O presente estudo corroborou com os trabalhos de Timken, Klein, Buoncristiani (2018) quando salientam que as modificações de metodologias podem ser realizadas com instrumentos e reagentes que já estão disponíveis no laboratório, para que a implementação seja relativamente prática e de baixo custo.

A modificação adotada neste trabalho também forneceu resultados favoráveis quando comparado com o método diferencial orgânico em termos de quantidade e qualidade de DNA amplificado, com base nos resultados de quantificação por PCR em tempo real.

Nesta pesquisa foi utilizado o sistema *Plexor™ HY* de quantificação, que apresenta vantagens como acurácia nos resultados, detecção mais sensível, consistente e reprodutível de DNA, boa especificidade para STR humano total e de cromossomo Y e maior velocidade de reação.

Para Ip, Lin e Lai (2015) os procedimentos de extração de DNA devem efetivamente remover inibidores e maximizar a recuperação de DNA contido em amostras biológicas

comumente submetidas à análise em laboratório forense. Para minimizar os efeitos de inibidores porventura presentes nas amostras, os autores sugerem a utilização de dispositivos de filtração como a membrana tipo Microcon<sup>®</sup>, bem como a utilização de partículas magnéticas, exemplo da resina do kit *DNA IQ™ System*, para a concentração de DNA. Este kit descrito pelos autores é o mesmo utilizado na técnica proposta neste trabalho.

A membrana purificadora Microcon<sup>®</sup> foi utilizada no método de lise diferencial orgânica enquanto a resina magnética do kit comercial foi utilizada na metodologia da presente pesquisa. Os resultados obtidos em ambos os métodos estudados não obtiveram valores alterados de IPC, o que demonstra uma eficiência na produção de DNA amplificado livre de inibidores de PCR, porém houve um acréscimo de cerca de 10 vezes na recuperação DNA autossômico e de cromossomo Y quando utilizada a técnica adaptada com resina magnética.

Estes resultados estão em conformidade com Fregeau e Moors (2012) quando explicam que as partículas magnéticas do kit *DNA IQ™ System* fabricadas com dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>) e magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) com diâmetro de 12 +/- 4 µm possuem uma macroporosidade muito baixa. Esta condição maximiza a ligação do DNA, assegurando ligação mínima de possíveis contaminantes presentes na amostra. Os contaminantes vinculados às esferas são facilmente lavados, resultando em extratos de DNA limpos.

Segundo os mesmos autores, Fregeau e Moors (2012), a baixa macroporosidade das esferas paramagnéticas do kit *DNA IQ™ System* são responsáveis também pela diminuição da propensão das proteínas para se ligarem aos grânulos do kit na presença de sais caotrópicos. Davoren et al (2007) relatam que estes sais rompem pontes de hidrogênio ao mesmo tempo em que mediam as ligações altamente específicas do DNA com as partículas magnéticas por meio de pontes salinas iônicas.

Estes fatores justificam uma quantidade maior de DNA amplificado quando utilizou-se a resina magnética, visto que o DNA extraído com o kit *DNA IQ™ System* apresentou uma concentração de DNA humano maior do que a técnica diferencial orgânica.

Em casos de crimes sexuais é importante fazer a coleta do *swab* vaginal ou anal em um curto período de tempo após o crime, pois as primeiras 72 horas são cruciais para a detecção de espermatozoides depois da agressão sexual. Acredita-se que o trauma psicológico aliado ao preconceito social e ao medo dos agressores, na maioria integrantes do seu núcleo social, dificultam o comparecimento das vítimas de estupro aos órgãos de polícia e posteriormente aos núcleos periciais de medicina legal para serem submetidas a exame de corpo de delito.

Para Hulme, Lewis e Davidson (2013) além das coletas tardias em casos de agressão sexual, outro fator que dificulta a detecção de espermatozoides é a diluição da amostra no corpo

da vítima ao lavar a área genital após o coito. Muitas mulheres quando violentadas tem o hábito de tomar banho imediatamente, fazendo uma higiene íntima.

A coleta em vítima *post mortem* quando o corpo é jogado em rio, lago ou mar também dificulta o processo (AKKAYA et al, 2013). O número de agressores, a presença/ausência de ejaculação, as características de sêmen do agressor, as condições de coleta das amostras e armazenamento, conservação inadequados e a presença de material masculino inferior a 10% em uma mistura com células femininas podem diminuir probabilisticamente a obtenção de um perfil genético masculino viável (BARBARO; CORMACI; BARBARO, 2004).

Todos os fatores acima citados podem justificar a recuperação abaixo do esperado ou a não recuperação de DNA em algumas amostras desta pesquisa, tanto para DNA autossômico quanto para DNA de cromossomo Y pelo método orgânico e pelo método utilizando o kit *DNA IQ™ System*.

Os perfis genéticos completos do sexo masculino obtidos na presente pesquisa puderam ajudar a solucionar vários casos de crimes sexuais cujas análises das amostras estavam sob a responsabilidade do laboratório de DNA do Instituto de Polícia Científica da Paraíba, confrontando-os com perfis genéticos de supostos agressores ou por meio da inserção no banco nacional de perfis genéticos, do qual o estado da Paraíba faz parte, prevenindo futuros crimes com a identificação de criminosos em série e diminuindo a impunidade.

## 6 CONCLUSÕES

Das 50 amostras de crimes sexuais analisadas foi possível a obtenção de DNA espermático na extração por lise diferencial com a utilização do kit de extração *DNA IQ™ System*.

A utilização do kit *DNA IQ™ System* forneceu resultados favoráveis em quantidade de DNA masculino autossômico e do cromossomo Y, quando comparados com a técnica de extração diferencial orgânica.

A adaptação da metodologia utilizando o kit comercial apresentou maior rapidez de execução da extração, proporcionando maior celeridade na conclusão das análises laboratoriais e liberação mais rápida de resultados.

A metodologia com partículas magnéticas por meio do kit de extração *DNA IQ™ System* demonstrou ser mais eficiente que o método diferencial orgânico com a eliminação de solventes orgânicos tóxicos, especificamente fenol e clorofórmio, garantindo maior segurança à saúde do analista forense.

Foi demonstrada a viabilidade do método proposto na presente pesquisa como um protocolo alternativo na rotina dos laboratórios de Genética Forense para extração de DNA por lise diferencial, podendo ser de extrema utilidade na resolução de casos de crime sexual.

## REFERÊNCIAS

ABNT-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 14725-2: Produtos químicos - Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente Parte 2: Sistema de classificação de perigo.** Rio de Janeiro: ABNT, 2009.

AKKAYA, H. et al. Time-dependent changes of sperm cells in human ejaculate samples added in various liquid media. **Forensic Science International**, v. 231, p. 325-330, 2013.

BARBARO, A; CORMACI, P. DNA analysis from mixed biological materials. **Forensic Science International**, v. 146, p.123-125, 2004.

BIENVENUE J. M. et al. Microchip-Based Cell Lysis and DNA Extraction from Sperm Cells for Application to Forensic Analysis. **Journal of Forensic Sciences**, v. 51, n. 2, 2006.

BOGAS, V. et al. Comparison of four DNA extraction methods for forensic application. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, n. 1, p 194-195, 2011.

BOWDEN, A; FLEMING, R; HARBISON, S. A method for DNA and RNA co-extraction for use on forensic samples using the Promega DNA IQ™ System. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 1, p. 64-68, 2011.

BRASIL. **Lei nº 12.015, de 07 de agosto de 2009.** Altera o Título VI da Parte Especial do Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940 - Código Penal, e o art. 1º da Lei nº 8.072, de 25 de julho de 1990, que dispõe sobre os crimes hediondos, nos termos do inciso XLIII do art. 5º da Constituição Federal e revoga a Lei nº 2.252, de 1º de julho de 1954, que trata de corrupção de menores. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Lei/L12015.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Lei/L12015.htm).

BRASIL. **Lei nº 8.072/90, de 25 de julho de 1990.** Dispõe sobre os crimes hediondos, nos termos do art. 5º, inciso XLIII, da Constituição Federal, e determina outras providências. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L8072.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L8072.htm)

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. **Norma Regulamentadora nº 15.** Atividades e Operações Insalubres. **Diário Oficial da União**, 2011. Disponível em: [http://mte.gov.br/legislação/normas\\_regulamentadoras](http://mte.gov.br/legislação/normas_regulamentadoras).

BRASIL. Ministério da Segurança Pública. **VIII Relatório da Rede Integrada de Banco de Perfis Genéticos (RIBPG).** 2018. Disponível em: <https://aspecgo.com.br/wp-content/uploads/2018/09/VIII-RELAT%C3%93RIO-DA-REDE-INTEGRADA-DE-BANCOS-DE-PERFIS-GEN%C3%89TICOS-RIBPG-final.pdf>.

BUDOWLE, B. et al. **DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis**. Eaton Publishing, Natick, 2000.

BUDOWLE, B; BIEBER, F. R; EISENBERG, A. J. Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. **Legal Medicine**, v. 7, n. 4, p. 230-243, 2005.

BUTLER, J. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology**. San Diego: Academic Press, 2012.

BUTLER, J. **Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers**. 2. ed. New York: Academic Press, 2005.

CARVALHO, H. G. de A. **Extração de DNA de Ossos Humanos, sem pulverização, para uso em identificação forense**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

CHEN, J. et al. A physical method for separating spermatozoa from epithelial cells in sexual assault evidence. **Journal of Forensic Sciences**, v. 43, n. 1, p. 114-118, 1998.

CORTE-REAL, F; VIEIRA, D. N. **Princípios de genética forense**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, [s.n.]. 204 p. ISBN 978-989-26-0956-0, 2015.

COSTA, S. et al. The use of laser microdissection in forensic sexual assault casework: pros and cons compared to standard methods. **Journal of Forensic Sciences**, v. 62, n. 4, p. 998-1006, 2017.

COTTON, R. W; FISHER, M. B. Properties of sperm and seminal fluid, informed by research on reproduction and contraception. **Forensic Science International: Genetics**, v. 18, p. 66-77, 2015.

DAVOREN, J. et al. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. **Croatian Medical Journal**, v. 48, n. 4, p. 478-485, 2007.

DREZETT, J. et al. Influência do exame médico-legal na responsabilização do autor da violência sexual contra adolescentes. **Journal of Human Growth and Development**, v. 21, n. 2, p. 189-197, 2011.

FAÚNDES, A. et al. Violência sexual: procedimentos indicados e seus resultados no atendimento de urgência de mulheres vítimas de estupro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 2, p. 126-135, 2006.

FONTANA, F. et al. Isolation and genetic analysis of pure cells from forensic biological mixtures: The precision of a digital approach. **Forensic Science International: Genetics**, v. 29, p. 225-241, 2017.

FRÉGEAU, C. J; DE MOORS, A. Competition for DNA binding sites using Promega DNA IQ™ paramagnetic beads. **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, n. 5, p. 511-522, 2012.

GE, J. et al. Future directions of forensic DNA databases. **Croatian Medical Journal**, v. 55, n. 2, p. 163-166, 2014.

GILL, P; WERRETT, D. J. Exclusion of a man charged with murder by DNA fingerprinting. **Forensic Science International**, v. 35, p.145-148, 1987.

GILL, P; JEFFREYS, A. J; WERRETT, D. J. Forensic application of DNA ‘fingerprints’. **Nature**, v. 318, n. 6046, p. 577-579, 1985.

GÓES, A. C. S. et al. Identification of a criminal by DNA typing in a rape case in Rio de Janeiro, Brazil. **São Paulo Medical Journal**, v. 120, n. 3, p.77-80, 2002.

HENNEKENS, C. M. et al. The effects of differential extraction conditions on the premature lysis of spermatozoa. **Journal of Forensic Sciences**, v. 58, n. 3, p. 744-752, 2013.

HERNANDEZ-OCHOA, I. et al. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 2, p. 171-178, 2006.

HULME, P; LEWIS, J; DAVIDSON, G. Sperm elution: an improved two phase recovery method for sexual assault samples. **Science & Justice**, v. 53, n. 1, p. 28-33, 2013.

INTERPOL. **Fact Sheet. DNA Profiling**. COM/FS/2015-02/FS-01, 2015. Disponível em: <https://www.interpol.int/en/News-and-media/Publications/Fact-sheets/DNA-Profiling>.

IP, S. C. Y; LIN, S; LAI, K. An evaluation of the performance of five extraction methods: Chelex®100, QIAamp® DNA Blood Mini Kit, QIAamp® DNA Investigator Kit, QIASymphony® DNA Investigator® Kit and DNA IQ™. **Science & Justice**, v. 55, n. 3, p. 200-208, 2015.

IRANPOUR, F. G. The effects of protamine deficiency on ultrastructure of human sperm nucleus. **Advanced Biomedical Research**, v. 3:24, 2014.

JEFFREYS, A. J; WILSON, V; THEIN, S. L. Individual-specific ‘fingerprints’ of human DNA. **Nature**, v. 316, n. 6023, p. 76-79, 1985.

JEFFREYS, A. J; WILSON, V; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v.314, n. 6006, Mar 7-13, p. 67-73. 1985.

JOBIM, L. F; COSTA, L. R; DA SILVA, M. **Identificação Humana: Identificação pelo DNA, Identificação Médico-Legal e Perícias Odontológicas (Tratado de perícias criminalísticas)**. Vol II. 2. ed. Campinas: Millenium Editora, 2006.

JOBLING, M. A; GILL, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 10, p. 739-751, 2004.

KATILIUS, E. et al. Sperm cell purification from mock forensic swabs using SOMAmer™ affinity reagents. **Forensic Science International: Genetics**, v. 35, p. 9-13, 2018.

KELTY, S. F. et al. Dismantling the justice silos: Flowcharting the role and expertise of forensic science, forensic medicine and allied health in adult sexual assault investigations. **Forensic Science International**, v. 285, p. 21-28, 2018.

KOCH, A; ANDRADE, F. M. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40 (1), p. 17-23, 2008.

LEITE, V. S. et al. **Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense**. Derecho y Cambio Social. ISSN: 2224-4131. Depósito legal: 2005-5822., n. 34, 2013. Disponível em: [http://www.derechoycambiosocial.com/revista034/USO\\_DAS\\_TECNICAS\\_DE\\_BIOLOGIA\\_MOLECULAR\\_NA\\_GENETICA\\_FORENSE.pdf](http://www.derechoycambiosocial.com/revista034/USO_DAS_TECNICAS_DE_BIOLOGIA_MOLECULAR_NA_GENETICA_FORENSE.pdf)

LIMA, R. S. **Anuário Brasileiro de Segurança Pública 2018**. Fórum Brasileiro de Segurança Pública. 2018. Disponível em: <http://www.forumseguranca.org.br/publicacoes/anuario-brasileiro-de-seguranca-publica-2018/>.

LOUNSBURY, J. A. et al. Enhanced recovery of spermatozoa and comprehensive lysis of epithelial cells from sexual assault samples having a low cell counts or aged up to one year. **Forensic Science International: Genetics**, v. 8, n. 1, p. 84-89, 2014.

MANDRIKAR, P. V; KRENKE, B. E; TEREBA, A. **DNA IQ™. The Intelligent Way to Purify DNA**. 2001. Disponível em: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/profiles-in-dna/403/dna-iq-the-intelligent-way-to-purify-dna.pdf?la=en>.

MAPES, A. A; KLOOSTERMAN, A. D; DE POOT, C. J. DNA in the criminal justice system: the DNA success story in perspective. **Journal of Forensic Sciences**, v. 60, n. 4, p. 851-856, 2015.

MOTA, M. F; FINOTTI, N. C. P. **Contribuição do Banco de Perfis Genéticos da Superintendência de Polícia Técnico-Científica do Estado de Goiás com a elucidação de crimes após três anos de funcionamento**. Revista Brasileira de Criminalística, v. 7, n. 1, p.

26-31, 2018. ISSN 2237-9223. Disponível em: <http://rbc.org.br/ojs/index.php/rbc/article/view/193>.

NAGY, M. et al. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. **Forensic Science International**, v. 152, n. 1, p. 13-22, 2005.

NG, H. H. et al. Modified differential DNA extraction to reduce processing time of sexual assault exhibits. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 6, p. e252-e254, 2017.

PAJNIČ, I. Z; POGORELC, B. G; BALAŽIČ, J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second World War Konfin I mass grave in Slovenia. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 4, p. 307-317, 2010.

PROMEGA. **Technical Bulletin DNA IQ™ System - Database Protocol**. Disponível em : [www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/dna-iq-system-database-protocol.pdf](http://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/dna-iq-system-database-protocol.pdf).

RODRIGUEZ, J. J. R. B. et al. **Non-differential DNA extraction of post-coital samples submitted as evidence for investigating sexual assault cases in the Philippines**. *Philippine Science Letters*, v.10, n. 1, p. 14-21, 2017. Disponível em: <http://philsciletters.org/2017/PSL%202017-vol10-no01-p14-21%20Rodriguez.pdf>.

SCHOELL, W. M. J. et al. Separation of sperm and vaginal cells with flow cytometry for DNA typing after sexual assault. **Obstetrics and Gynecology**, v. 94, n. 4, p. 623-627, 1999.

SILVA, R. V; GREGOLI, R; RIBEIRO, H. M. **Visível e Invisível: A vitimização de mulheres no Brasil**. 25-28, 2017. Acessível em: [.http://www.forumseguranca.org.br/wp-content/uploads/2017/03/relatorio-pesquisa-vs4.pdf](http://www.forumseguranca.org.br/wp-content/uploads/2017/03/relatorio-pesquisa-vs4.pdf).

SILVA, N. M. et al. **Human neutral genetic variation and forensic STR data**. **PLoS One**, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049666>.

TIMKEN, M. D; KLEIN, S. B; BUONCRISTIANI, M. R. Improving the efficacy of the standard DNA differential extraction method for sexual assault evidence. **Forensic Science International: Genetics**, v. 34, p. 170-177, 2018.

VLAHOVIĆ, M. K; KUBAT, M. DNA extraction method from bones using Maxwell® 16. **Legal Medicine**, v. 14, n. 5, p. 272-275, 2012.

VUICHARD, S. et al. Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a Swiss collaborative study. **Investigative Genetics**, v. 2, n. 1, p. 11, 2011.

WALSH, S. J. Legal perceptions of forensic DNA profiling: Part I: A review of the legal literature. **Forensic Science International**, v. 155, n. 1, p. 51-60, 2005.

WANG, J; MC CORD, B. The application of magnetic bead hybridization for the recovery and STR amplification of degraded and inhibited forensic DNA. **Electrophoresis**, v. 32, n. 13, p. 1631-1638, 2011.

WHO. **World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs**. Disponível em: [https://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2018/en/](https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2018/en/)

WILLIAMSON, V. R. et al. Enhanced DNA mixture deconvolution of sexual offense samples using the DEPArray™ system. **Forensic Science International: Genetics**, v. 34, p. 265-276, 2018.

WONG, H; MIHALOVICH, J. Automation of the Differential Digestion Process of Sexual Assault Evidence. **Journal of Forensic Sciences**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13877>.

YANAGIMACHI, R. Stability of the mammalian sperm nucleus. **Zygote**, v. 2, n. 4, p. 383-384, 1994.

YOSHIDA, K. et al. The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. **Forensic Science International**, v. 72, n. 1, p. 25-33, 1995.

## ANEXOS

### **Anexo 1. Protocolo de extração de DNA por lise diferencial adaptado utilizando o kit *DNA IQ™ System* (Promega)**

1. Em tubo estéril de 2 mL colocar alíquota da amostra previamente selecionada e adicionar tampão de extração da fração não espermática (FNE) [400 µL de Tris/EDTA/NaCl (10 mM Tris-HCl/1mM EDTA/100 mM NaCl; pH 8,0); 25µL de Sarkosil 20%; 75 µL de água ultrapura; 7,5 µL de Proteinase K 20 mg/mL]. Homogeneizar e incubar a 37°C por 5 horas;

2. Após a incubação, descartar os fragmentos de *swab* presentes no tubo, centrifugar a amostra a 12.000 RPM por 5 minutos e transferir o sobrenadante (FNE) para outro tubo estéril de 2 mL. O *pellet* presente no tubo compõe a fração espermática (FE).

3. Ao *pellet* com a fração espermática (FE) adicionar 500 µL de tampão de lavagem de esperma (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 50mM NaCl; SDS 2%; pH 7,5), centrifugar a 12.000 RPM por 5 minutos, remover e descartar o sobrenadante. Este processo de lavagem deve ser realizado três vezes, preservando o *pellet* contendo a fração FE.

4. Adicionar ao tubo contendo a FNE igual volume de etanol absoluto, centrifugar a 9600 RPM por 7 minutos e descartar o sobrenadante, restando um precipitado contendo a FNE. Guardar o tubo em geladeira até as etapas posteriores envolvendo a FNE.

5. Adicionar 100µL de tampão de lise do kit *DNA IQ™ System* e 1µL de DTT ao tubo contendo o *pellet* com a FE. Homogeneizar a amostra em vortex por 10 segundos e incubar em bloco seco a 95°C por 30 minutos.

6. Após esse período, retirar a amostra FE da incubação. Ao tubo contendo a fração não espermática (FNE) anteriormente precipitada com etanol absoluto adicionar 100µL de tampão de lise e 1µL de DTT.

7. Agitar a suspensão de resina magnética presente no kit *DNA IQ™ System* em vortex por 5 segundos a velocidade máxima e acrescentar 3,5µL aos tubos contendo as frações FE e FNE. Homogeneizar os tubos em vortex e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente, misturando a suspensão de uma a três vezes por inversão do tubo.

8. Agitar os tubos contendo a suspensão obtida em vortex por 5 segundos em alta velocidade e imediatamente colocá-los na estante magnética. Retirar o sobrenadante tomando o cuidado para não mover a resina com o DNA na parede tubo.

9. Adicionar 100µL do tampão de lavagem 1X do kit *DNA IQ™ System*, remover o tubo da estante magnética e agitar por 5 segundos a velocidade máxima em vortex. Colocar os tubos novamente na estante magnética para remoção do sobrenadante. Realizar o procedimento de lavagem três vezes. Todo o sobrenadante deve ser removido do tubo na última lavagem.

10. Com as tampas dos tubos abertas secar a resina durante 5 minutos. Após este período adicionar 50µL do tampão de eluição do kit *DNA IQ™ System*. Com as tampas fechadas agitar os tubos por 5 segundos em vortex a velocidade máxima e incubar a 65°C durante 5 minutos.

11. Em seguida, retirar os tubos do aquecimento, agitar por 5 segundos em vortex a velocidade máxima e colocar na estante magnética, imediatamente. Transferir o sobrenadante contendo o DNA extraído para recipientes de escolha.