



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CAROLINE GARCIA MAXIMIANO

TÉCNICAS FORENSES APLICADAS NA ANÁLISE DO SÊMEN

Trabalho de conclusão de curso, apresentado no formato de artigo científico ao UniCEUB como requisito parcial para a conclusão do curso de bacharelado em Biomedicina, sob orientação do professor Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz.

BRASÍLIA
2017

Técnicas forenses aplicadas na análise do sêmen

Caroline Garcia Maximiano¹
Paulo Roberto Martins Queiroz²

Resumo

O estupro é um tipo de agressão sexual realizada contra uma pessoa sem seu consentimento. O combate a este crime é algo de significativa importância para a segurança de toda a sociedade. Sendo assim, o objetivo geral desse trabalho foi apresentar técnicas, métodos e tecnologia avançada de detecção de vestígios e análise de DNA que ajudem e sejam capazes de resolver crimes de violência sexual. Foi realizada uma revisão da bibliografia utilizando os bancos de dados PUBMED, BVS e Google Acadêmico. Dentre as técnicas de detecção do vestígio (sêmen), está a utilização de fontes de luz especiais, tecnologia laser e esfregaço vaginal na vítima. Depois de confirmada a presença de espermatozoides, é preciso fazer a extração do DNA para submetê-lo à análise, fazendo em seguida a PCR para identificação dos marcadores STR, eletroforese capilar ou sequenciamento NGS. Com provas consistentes, evita-se que a justiça absolva criminosos, devido à falta de provas.

Palavras-chave: Sêmen; Espermatozoide; Estupro; Extração de DNA; PCR; STR; Sequenciamento NGS; Esfregaço vaginal.

Forensic techniques applied in semen analysis

Abstract

Rape is a type of sexual assault carried out against a person without his or her consent. The struggle against this crime is something of significant importance for the safety of the whole society. Thus, the overall objective of this work is to present advanced techniques, methods and technology for trace detection and DNA analysis that could help and be able to solve crimes of sexual violence. A review of the bibliography was done using the PUBMED, BVS and Google Academics databases. Amongst the techniques of detection of trace (semen), is the use of special light sources, laser technology and vaginal smear in the victim. After confirming the presence of spermatozoa, the DNA must be extracted for analysis, followed by PCR for the identification of STR markers, capillary electrophoresis or NGS sequencing. With consistent evidence, justice is prevented from acquitting criminals due to lack of evidence.

Keywords: Semen; Spermatozoa; Rape; DNA extraction; PCR; STR; NGS sequencing; Vaginal smear.

¹Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

²Biólogo, Dr. em Biologia Animal pela Universidade de Brasília - UnB; Professor de Biomedicina no Centro Universitário de Brasília – UniCEUB

1. Introdução

Estupro é um crime no qual o agressor força sua vítima a ter uma relação sexual, contra sua vontade. Muitas vezes, a vítima pode não conseguir identificar o autor do crime, por ficar tão traumatizada e não conseguir lembrar do rosto do agressor. Por outro lado, em um número pequeno de casos, a vítima até consegue identificar o criminoso, mas o suspeito pode facilmente negar a acusação, e sem nenhuma prova, ele é absolvido. Por conta dessa situação, a análise de evidências de abusos sexuais pode levar a informações vitais no processo de identificação do estuprador (SILVA et al., 2004).

O abuso sexual pode afetar muito o psicológico e o emocional das vítimas, e se ainda for criança, pode afetar também a cognição, o desenvolvimento físico, sua relação com os pais, e a relação entre os pais da criança (LINDAUER et al., 2014). Por essa razão, esse é um crime tão importante e relevante de se discutir e de conseguir sua elucidação.

Estima-se que a cada ano no Brasil 0,26% da população sofre violência sexual, o que indica que haja anualmente 527 mil tentativas ou casos de estupros consumados no país, dos quais 10% são reportados à polícia. Tal informação é consistente com os dados do Anuário do Fórum Brasileiro de Segurança Pública (FBSP) de 2013, que apontou que em 2012 foram notificados 50.617 casos de estupro no Brasil. Em 2011, foram notificados no SINAN 12.087 casos de estupro no Brasil, o que equivale a cerca de 23% do total registrado na polícia em 2012, conforme dados do Anuário 2013 do FBSP (CERQUEIRA; COELHO, 2014).

Técnicas para identificação individual tem sido desenvolvidas à base da análise de DNA, com alto potencial de discriminação e sensibilidade. A tipagem de DNA deverá ser conduzida para a identificação do culpado, o diferenciando dos demais suspeitos (SILVA et al., 2004).

Hoje em dia, nos casos de estupro, swabs vaginais de rotina podem ser coletados das vítimas para análise de DNA do agressor que pode estar atuando na região. O perfil genético e até mesmo o número de crimes envolvidos em abuso sexual podem ser determinados a partir da tipagem de DNA do esperma (GÓES et al., 2002).

Na maioria das vezes em que se faz uma coleta vaginal para se conseguir o esperma, células epiteliais da vítima vêm misturadas com células de espermatozoides do agressor na amostra. Com o objetivo de obter o perfil de

DNA do autor do crime, a comunidade forense de DNA vem trabalhando na separação de células de homens e mulheres (ZHAO et al., 2016).

As amostras retiradas das vítimas e que contenham sêmen irão ser preservadas em congelamento, para no futuro, confrontar com amostras de sangue de possível suspeito ou suspeitos. Atualmente, faz-se estudos relacionados às diferentes metodologias para a coleta vaginal, principalmente o lavado vaginal, para que a amostra fique a mais rica possível em espermatozoides, o que facilitará a análise (BONACCORSO, 2005).

O método tradicional para essa proposta é a lise diferencial, que envolve dois tipos de tampões de lise. O primeiro tampão que é sem ditiotreitól é usado para lisar principalmente as células epiteliais, e o segundo tampão contendo ditiotreitól é capaz de romper a ponte dissulfeto das proteínas que são responsáveis pela estrutura da membrana nuclear do espermatozoide (ZHAO et al., 2016).

Segundo Hung e colaboradores (2013) também há um outro método, com grânulos imunomagnéticos (IMBs). Com essa metodologia foi estabelecida a primeira ligação entre a tecnologia do IMB e o isolamento de espermatozoides vindos de células misturadas obtidas no esfregaço vaginal, usando um anticorpo contra a enzima angiotensina-convertase testicular (ANSLINGER, 2008).

Para melhorar a sensibilidade e a estabilidade do isolamento do espermatozoide, pode-se preparar grânulos magnéticos revestidos com o anticorpo anti-PH-20. O anti-PH-20 é uma hialuronidase de espermatozoide ancorada com glicosilfosfatidilinositol que permite que o espermatozoide intacto atinja a zona pelúcida do ovócito primário durante a fertilização. O IMB anti-PH-20 liga-se especificamente à cabeça do espermatozoide e exibe uma grande sensibilidade para o isolamento de células germinativas provenientes de células misturadas com células epiteliais (BABA et al., 2002). Segundo Zhao e colaboradores (2016) após a incubação do complexo IMB-espermatozoide com a DNase I, a eletroforese capilar dá origem a um perfil de STR de um único fornecedor.

Um dos principais métodos de análise para chegar de fato à identificação do autor do crime é analisar os microssatélites presentes nos espermatozoides coletados na cena do crime ou da própria vítima no lavado vaginal. Microssatélites ou sequências repetidas *in tandem* (STR) constituem aproximadamente 10% do genoma humano e podem ser utilizados como

marcadores moleculares na genotipagem do DNA, visando detectar a variabilidade genética populacional. Esses marcadores possuem de 2 a 6 pares de base e aparecem principalmente dispersos no genoma. Os microssatélites podem ser classificados de acordo com o tipo de repetição como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos (RODRIGUES et al., 2010).

Estes marcadores podem estar presentes tanto em regiões codificadoras, quanto em não codificadoras, estando associadas à regulação da expressão gênica e outras funções celulares (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002).

O número de repetições pode aumentar ou diminuir, caso ocorra a adição ou perda de uma ou mais unidades de repetição pela DNA polimerase e se houver falha na atividade exonucleásica dessa enzima (ELLEGRÉN, 2004).

A metodologia de genotipagem com STR baseia-se na amplificação por PCR das sequências simples repetidas, utilizando um par de iniciadores de sequências complementares àquelas que a flanqueiam. É uma técnica eficaz para analisar amostras com pouca quantidade de DNA ou com DNA degradado (KASHYAP et al., 2004). Desta forma, os marcadores microssatélites podem gerar grandes quantidades de informações genéticas que são disponibilizadas em bancos de dados (GILL et al., 2006).

Assim sendo, o objetivo geral desse trabalho foi apresentar técnicas, métodos e tecnologia avançada de detecção de vestígios e análise de DNA que ajudem e sejam capazes de resolver crimes de violência sexual.

2. Metodologia

Este trabalho trata-se de uma revisão de literatura no formato narrativo. A revisão da literatura é uma parte vital do processo de investigação. Aquela que envolve localizar, analisar, sintetizar e interpretar a investigação prévia relacionada com a sua área de estudo. É, então, uma análise bibliográfica pormenorizada, referente aos trabalhos já publicados a respeito do tema. A revisão da literatura é indispensável não somente para definir bem o problema, mas também para obter uma ideia precisa a respeito do estado atual dos conhecimentos sobre um dado tema, as suas lacunas e a contribuição da investigação para o desenvolvimento do conhecimento (BENTO, 2012).

Os artigos científicos para o desenvolvimento da revisão bibliográfica foram localizados por meio de busca sistemática, realizada no banco de dados

PUBMED (US National Library of Medicine), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e Google Acadêmico, publicados entre os anos de 2002 a 2016, também foram utilizados textos mais antigos por serem importantes para a fundamentação de alguns conceitos. As palavras chave usadas nas buscas foram: “análise”, “DNA”, “estupro”, “abuso sexual”, “espermograma”, “lavado vaginal”, “STR”, “microssatélites seminais”, assim como, as mesmas palavras no idioma inglês. Esses termos foram utilizados individualmente ou em combinações dois a dois e até em combinações de três. As aplicações das técnicas e dos conceitos foram realizadas após uma seleção a partir da leitura dos textos e observação da descrição nos artigos.

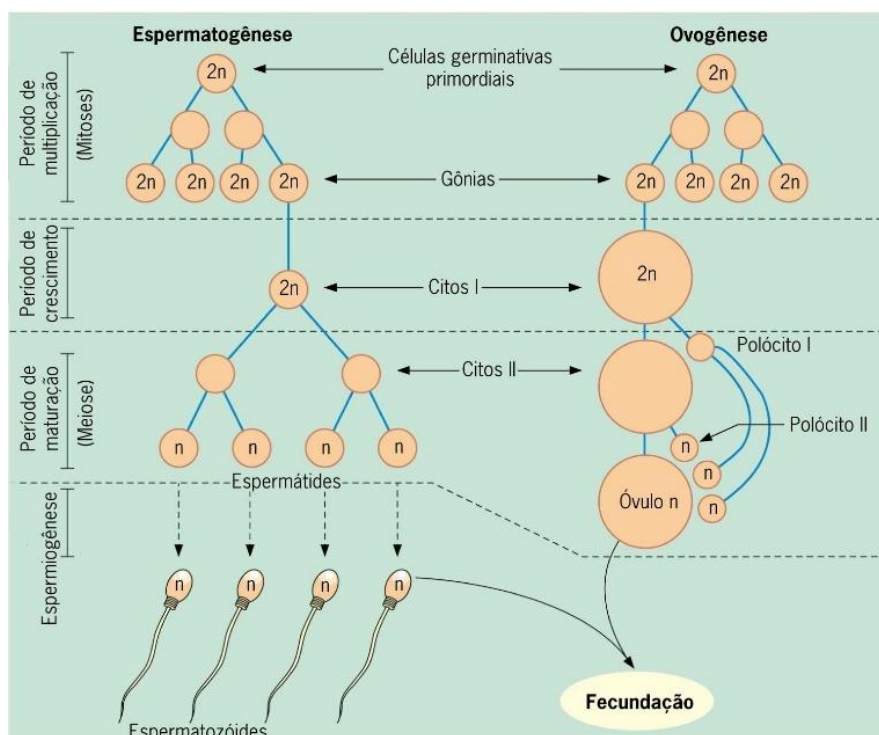
3. Desenvolvimento

3.1 Espermatogênese

Os gametas são células germinativas altamente especializadas e a gametogênese é o processo de formação e desenvolvimento dessas células. Esse processo, no qual envolve os cromossomos e o citoplasma dos gametas, prepara essas células sexuais para a fecundação. Durante a gametogênese, a quantidade de cromossomos é reduzida pela metade e o formato das células é modificada. Cada cromossomo condensado aparece como um par de bastões unidos em um determinado ponto, denominado centrômero. Antes da replicação do DNA, os cromossomos aparecem em cromátide única, ou seja, uma cromátide consiste em filamentos paralelos de DNA e, depois da replicação do DNA, eles se tornam cromátides duplas (MOORE; PERSAUD, 2008).

Na gametogênese, há a fase meiótica (Figura 1). De importância primordial da meiose, estão: 1) a redução do número de cromossomos de diploide ($2n$) para haploide ($1n$), de modo que o número de cromossomos continue a ser mantido de geração para geração; 2) a reorganização independente dos cromossomos tanto maternos quanto paternos, para uma melhor mescla de características genéticas; 3) a nova reordenação da informação genética materna e paterna por meio do processo de crossing-over no decorrer da primeira divisão meiótica (CARLSON, 2014).

Figura 1 – Imagem esquemática de uma espermatogênese e ovogênese desde a mitose das células germinativas até a fecundação.



Fonte: Cesar, Sezar e Caldini (2015).

A espermatogênese é um processo simultâneo e constante de diferenciação celular, pelo qual uma espermatogônia mãe, é gradativamente diferenciada em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide. Tal processo dura em torno de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos estudados (COSTA; PAULA, 2003) e começa nos túbulos seminíferos dos testículos após o início da puberdade. No sentido mais abrangente, o processo começa com a proliferação mitótica das espermatogônias. Na base do epitélio seminífero existem variadas populações de espermatogônias, a do tipo A representa a população de célula-tronco que mantém mitoticamente o número adequado de espermatogônia ao longo da vida, ela dá origem à espermatogônia do tipo B, que é destinada a terminar com o ciclo mitótico e entrar em meiose. A entrada na meiose é estimulada pelo ácido retinoico (um derivado da vitamina A). Muitas espermatogônias e seus descendentes celulares são conectados por pontes citoplasmáticas intercelulares, que podem ser fundamentais na manutenção do desenvolvimento sincronizado de grandes grupos de células spermáticas (CARLSON, 2014).

As espermatogônias tipo A não têm heterocromatina no seu núcleo e as espermatogônias tipo B apresentam núcleos com massas de cromatina intensamente coradas, adjacentes ao envoltório nuclear. O núcleo de uma espermatogônia B exibe nucléolo central. As espermatogônias são células arredondadas com um diâmetro de aproximadamente 12 μm . Apresentam-se apoiadas na membrana basal dos túbulos seminíferos. Seus núcleos são arredondados ou ovoides, com 6 a 7 μm de diâmetro (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2012).

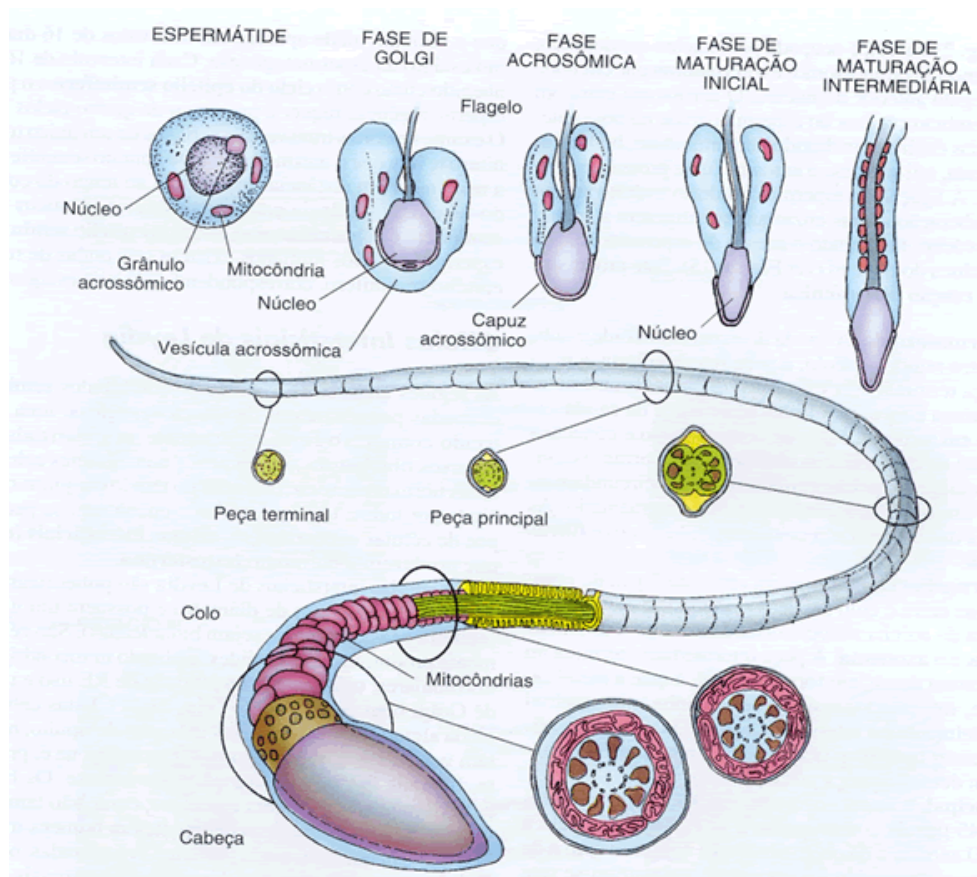
Durante a fase da mitose, as células tronco dão origem a duas novas células, uma vai auxiliar na renovação da população de mais células tronco, e a outra entra no decurso de espermatogênese. Esse processo, então, vai dar origem às espermatogônias intermediárias, que irão se dividir para formar as espermatogônias B. Ao fim da divisão, as espermatogônias B, dão então, origem a outras células que iniciam uma extensa fase de meiose. Posteriormente, tais células serão acondicionadas dentro do compartimento adluminal do epitélio seminífero. Todos os tipos celulares subsequentes vão ficar no compartimento adluminal. Neste compartimento as células ficam isoladas e sem acesso direto a nutrientes e hormônios, ficando então, totalmente dependentes das células de Sertoli para prover suas necessidades. A fase da meiose abrange a síntese de DNA nos espermatócitos na fase de pré-leptóteno, síntese de RNA em espermatócitos em paquíteno e no final da meiose, estes últimos constituem as espermatídes haplóides (COSTA; PAULA, 2003).

Ao final da espermatogênese, ocorre um processo chamado de espermiogênese, que é a diferenciação de espermatíde em espermatozóide, e implica em um rearranjo dos componentes celulares, assim como, a criação de estruturas necessárias para a fecundação. O conjunto desse elaborado processo de transformações envolve os seguintes aspectos: 1) condensação e alongamento do núcleo; 2) formação do acrossomo a partir do complexo de Golgi; 3) formação do flagelo; 4) deslocamento de uma bateria mitocondrial, constituindo uma bainha de mitocôndrias periféricas na peça intermediária; 5) perda significativa de citoplasma. Com o final da espermiogênese ocorre a perda do citoplasma residual das espermatídes que ainda permaneciam ligadas entre si por continuidades citoplasmáticas. As células de Sertoli encarregam-se de fagocitar os corpos residuais, resultando no desprendimento e na liberação dos espermatozoides para o lúmen do túbulo seminífero e, posteriormente, para o

epidídimo. O processo de liberação dos espermatozoides do arranjo sincicial é conhecido como espermição (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2012).

É possível observar o processo de espermiogênese na figura 2 a seguir.

Figura 2 – Processo de diferenciação celular de espermatíde para espermatozoide, o qual é denominado espermiogênese.



Fonte: Gartner e Hiatt (2003).

3.2 Estrutura celular do espermatozoide humano

O citoplasma é a matéria funcional especializada das células e está localizada entre a membrana plasmática e o núcleo. Várias pequenas estruturas compõem boa parte do citoplasma, e são denominadas organelas, e junto com as organelas está presente também um líquido que funciona como ambiente interior de cada célula. As organelas encontradas no citoplasma são, ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndrias, lisossomos, centríolos, cílios e flagelos. O flagelo é uma posição isolada que se estende da superfície celular, no ser humano, ele se encontra apenas nos

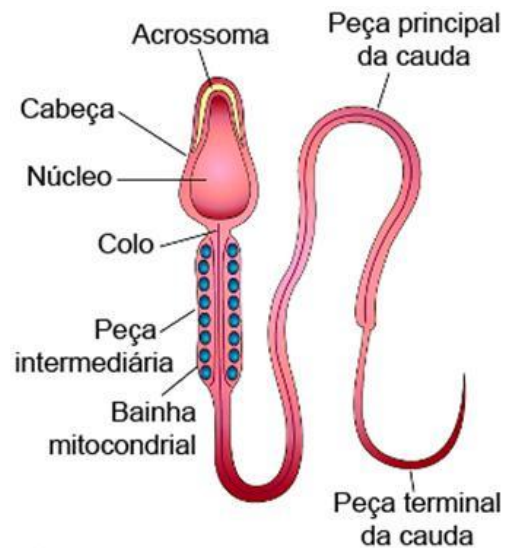
homens, é a cauda do espermatozoide. Os movimentos do flagelo ajudam os espermatozoides a chegarem ao óvulo, quando depositados no trato genital feminino (THIBODEAU; PATTON, 2001).

O espermatozoide, portanto, consiste no seguinte: uma cabeça (2 um a 5 um de comprimento) contendo o núcleo e o acrossomo; uma peça intermediária contendo os centríolos, a parte proximal do flagelo, e a espiral mitocondrial; e a cauda (cerca de 50 um de comprimento), que consiste em um flagelo altamente especializado (CARLSON, 2014).

O núcleo apresenta um aspecto achatado com as seguintes dimensões: 4,5 um de comprimento, 3 um de largura e 1 um de espessura. Ele é responsável pela transmissão dos caracteres hereditários paternos, conserva apenas o verdadeiro material dos genes, e apresenta cromatina extremamente densa, compacta e homogênea, não permitindo resolução de detalhes. O acrossomo origina-se do complexo de Golgi e forma um capuz com dupla membrana, o capuz acrossômico, que apresenta no seu interior glicoproteínas e enzimas lisossômicas importantes na fecundação, que são utilizadas para dissolver as membranas do ovócito. A cauda é dividida em: colo, região que faz conexão entre a cabeça e a cauda; peça intermediária, segmento de 5 a 7 μm de comprimento em torno de 1 μm de espessura; bainha mitocondrial, as mitocôndrias são responsáveis pelo fornecimento de energia para a propulsão do espermatozoide; peça principal, estende-se a partir da peça intermediária até quase o final da cauda, e seu comprimento está em torno de 45 μm ; peça terminal, é o segmento terminal do flagelo e tem um comprimento de aproximadamente 5 μm (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2012).

Todas as estruturas do espermatozoide humano podem ser observadas na Figura 3, que segue abaixo:

Figura 3 – Esquema de um espermatozoide humano mostrando todas as suas estruturas desde a cabeça até a parte terminal da cauda.



Fonte: Moore e Persaud (2008).

3.3 Transporte dos espermatozoides

Após a espermiogênese nos túbulos seminíferos, os espermatozoides são morfologicamente maduros, mas são imóveis e incapazes de fertilizarem um ovócito. Os espermatozoides são transportados passivamente, via líquido testicular, a partir dos túbulos seminíferos para a cabeça do epidídimo através da rede testicular e dos dutos eferentes. Eles são impulsionados pela pressão do líquido provocada nos túbulos seminíferos e são auxiliados pelas contrações do músculo liso e pelas correntes ciliares nos dutos eferentes. Os espermatozoides passam cerca de 12 dias no duto epididimário altamente enovelado, que mede 6 m nos humanos, e durante esse tempo eles sofrem a maturação bioquímica. O período de maturação está associado às mudanças nas glicoproteínas da membrana plasmática da cabeça dos espermatozoides. No momento em que os espermatozoides alcançam a cauda do epidídimo, eles são capazes de fertilizar um ovócito (THIBODEAU; PATTON, 2001).

Na ejaculação os espermatozoides passam rapidamente através do duto deferente e se misturam às secreções líquidas das vesículas seminais e da próstata. O líquido prostático é rico em ácido cítrico, fosfatase ácida, íons zinco e magnésio, enquanto o líquido da vesícula seminal é rico em frutose (a principal fonte de energia dos espermatozoides) e prostaglandinas. Os 2 mL a 6 mL de

ejaculado (sêmen) tipicamente consistem em 40 a 250 milhões de espermatozoides misturados ao líquido alcalino das vesículas seminais (60% do total) e às secreções ácidas da próstata, com pH 6,5 (30% do total). O pH do sêmen normalmente varia de 7,2 a 7,8 (CARLSON, 2014).

3.4 Composição do sêmen

O sêmen é um fluido corporal de aspecto leitoso, levemente amarelo, opalescente. É o resultado de uma mistura de secreções oriundas dos testículos, da próstata, glândula seminal e glândulas bulbouretrais. Os constituintes do sêmen derivam de duas fontes: esperma e líquido seminal. O líquido seminal é gerado pela contribuição da vesícula seminal, próstata e glândulas bulbouretrais. Possui um pH de aproximadamente 7,2 e na sua composição estão presentes essencialmente líquido seminal e espermatozoides, estes podem ser separados por centrifugação (SALADIN, 2002).

O líquido seminal do ser humano contém um complexo de elementos orgânicos e inorgânicos, que oferecem um meio nutritivo e protegido para os espermatozoides no sistema reprodutor feminino. O ambiente normal da vagina é desfavorável para as células do esperma, já que ele é bem ácido, viscoso, e composto por células imunes. Os componentes do plasma seminal tentam compensar este ambiente hostil (VAZ, 2008).

Proteínas e enzimas também são elementos que compõem o líquido seminal. Pequenas quantidades de globulinas, albumina, nucleoproteínas, proteases e uma amilase de pH 6-7, uma tromboquinase, coagulase, fosfatase ácida (de grande valor pericial), fosfatase alcalina, fibrinolizina, fibrinogenese e colina. A colina está presente em todas as células, trata-se de uma base orgânica constituída por lecitina. Intervêm no transporte de lipídios e no seu metabolismo formando os fosfolipídeos (SALADIN, 2002).

O cheiro e sabor do sêmen são devidos a aminas básicas, como a putrescina, espermina, spermidina e cadaverina. Essas bases alcalinas fazem o papel de neutralizar o ambiente ácido do canal vaginal (que é muito nocivo ao esperma), e protegem o DNA dentro do esperma da desnaturação ácida. Entre as substâncias ricas em fósforo está o difosfato de espermina que possui a fórmula química geral seguinte: $C_{10}H_{26}N_4H_3 \cdot 2PO_4H_3 \cdot 6H_2O$. O sêmen humano contém 112-268 mg% de fosfato de espermina, uma das bases do sêmen, e uma

outra base é a espermidina, que é o resultado parcial da hidrólise da espermina. O sêmen é composto por substâncias proteicas, como a frutose, e não proteicas como: Cloreto de Sódio, Dióxido de carbono, Fósforo inorgânico, Fósforo Ácido solúvel, Fósforo de espermina, Cálcio, Glicose, Ureia, Ácido Láctico e Colesterol. A ejaculação normal liberta entre 1,5 a 6 ml de fluido (VAZ, 2008).

3.5 Análise forense do sêmen

Estudar os fluidos seminais que estão presentes na cena do crime está diretamente ligado a crimes de violência sexual. Possui uma importância primordial quanto à reconstrução do momento do crime e para identificar e encontrar o agressor. Além de caracterizar o contato sexual, a pesquisa de esperma tem por objetivo a individualização da evidência biológica para confronto com possíveis suspeitos (VAZ et al. 2008).

O sêmen é produzido pelo sistema reprodutor masculino e é a estrutura líquida que contém os espermatozoides. Tal vestígio pode ser detectado em manchas nos lençóis, móveis, vestuário, almofadas, no chão, veículos, entre outros (ESPÍNDULA, 2008).

Dado que os exames que se realizam ao sêmen se baseiam principalmente na presença de espermatozoides, é importante a proteção das amostras que os contenham. Muitos peritos na área consideram que a presença de um espermatozoide completo é a única prova irrefutável da presença de sêmen. Por esta razão, estes vestígios devem manipular-se com extremo cuidado, no caso de manchas em vestuário, não se deve dobrar nem enrolar a zona manchada e sobretudo não a submeter a fricção (VAZ et al., 2008).

Antes do sêmen secar, ele possui um odor alcalino bem específico e contém milhões de espermatozoides. Depois que seca, o seu odor é perdido, os espermatozoides morrem, apresenta uma cor branco acinzentada ou amarelada, proporcionando aos tecidos um efeito engomado. O sêmen pode estar sujeito a análises forenses como, por exemplo, identificação do sêmen; determinação da sua origem (se é humana ou não); detecção do grupo sanguíneo; reconhecimento do tipo de ejaculação (que pode ser interna ou externa); condições toxicológicas (detecção de drogas); exames genéticos (DNA), entre outros (ESPÍNDULA, 2006).

3.6 Levantamento das técnicas

Todas as técnicas que serão mencionadas e descritas a seguir, estão dispostas na ordem em que são realizadas desde a detecção do vestígio, até a análise de DNA na qual é possível identificar o agressor. Isso pode ser visualizado no quadro 1, onde as técnicas estão na ordem a serem realizadas, e separadas por finalidades.

Quadro 1 – Separação de técnicas por finalidades e ordem a serem realizadas.

1. Técnicas de detecção de vestígios	2. Métodos de análise do vestígio	3. Técnicas de análise de DNA
<ul style="list-style-type: none"> - Utilização de fontes de luz - Tecnologia laser - Esfregaço vaginal 	<ul style="list-style-type: none"> - Separação de células epiteliais e espermatozoide - Extração de DNA 	<ul style="list-style-type: none"> - PCR - Eletroforese capilar - STR - Sequenciamento NGS (tecnologia mais avançada).

Fonte: Autoria própria.

3.7 Técnicas Aplicadas à Análise do Sêmen

3.7.1 Utilização de fontes de luz especiais

A técnica de levantamento de dados físico-químicos através da transmissão, absorção ou reflexão da energia radiante ou luz incidente numa amostra é denominada espectroscopia. São usadas fontes de luz especiais na área forense com a intenção de mostrar indícios que não são visíveis a olho nu perante a luz ambiente. A mesma fonte de luz pode ser utilizada para fotografar os vestígios, ou puramente para indicar a sua localização física possibilitando assim, a sua coleta. Tais provas podem ser "invisíveis" por várias razões, por exemplo, é possível que haja apenas um "rastros", como uma pequena gota de sangue ou um único fio de cabelo, e o material pode ser incolor, como uma mancha de sêmen. As fontes de luz podem ser usadas para transparecer essas evidências, a fim de melhorar a visibilidade do vestígio encontrado (VAZ, 2008).

O fenômeno da fluorescência é quando um objeto específico absorve a luz de um determinado comprimento de onda emitindo quase simultaneamente

uma cor. Na área forense, a chamada “luz negra” foi a primeira fonte de luz utilizada. As lâmpadas fluorescentes produzem luz passando eletricidade por intermédio de um tubo cheio de gás estático e uma pequena quantidade de mercúrio (ESPÍNDULA, 2008).

O fósforo tem como característica intrínseca ser um elemento fosforescente. Quando um fóton atinge um átomo de fósforo, um dos elétrons do fósforo salta para um nível mais alto de energia, fazendo com que o átomo vibre e então gere calor. Quando o elétron do fósforo retorna para seu nível habitual, ele libera energia na forma de outro fóton. Esse fóton, porém, terá menos energia do que o fóton original, pois parte da energia foi perdida na forma de calor. Em uma lâmpada fosforescente, a luz que é emitida está no espectro visível, e o fósforo emite a luz branca necessária para a sua visualização (VAZ, 2008). A luz visível tem um espectro de 400 a 800 nm, já radiação ultravioleta (UV), tem um comprimento de onda entre 100 e 400 nm, e a infravermelha, de 800 a 1700 nm, sendo então espectros de luz que não são visíveis aos olhos humanos (ARAÚJO; SOUZA, 2008).

A luz ultravioleta (UV) emitida reage com o fósforo externo exatamente do mesmo modo que a luz UV reage com o revestimento de fósforo dentro de uma lâmpada fosforescente. O fósforo externo reluz enquanto a luz UV incide sobre ele, assim, a lanterna de luz negra revela, essencialmente, tudo o que contém fósforo, por exemplo, os fluidos corporais, cabelos, fibras, entre outros vestígios. Para os fluidos corporais, como o sêmen, a saliva e fluidos vaginais, este tipo de luz é o único método de revelação. Usando um contraste com radiação visível como, por exemplo os óculos cor-de-laranja, a detecção dos vestígios é ainda mais fácil (VAZ, 2008).

3.7.2 Tecnologia laser

A tecnologia *laser* permite “varrer” o local do crime à procura de variados tipos de evidências forense, em um curto intervalo de tempo. Ele é indispensável para o sucesso de uma perícia, principalmente porque a maioria dos cenários de crime degradam-se com o tempo. No caso do sêmen, os espermatozoides demoram por volta de 48 a 72 horas para se degradarem (VAZ, 2008).

Tal sistema permite a geração de milhões de pontos 3D, com a emissão de feixes de *laser* para o ambiente de investigação durante a rotação, com um

ângulo horizontal de até 360° e um ângulo vertical de até 310°. Os objetos digitalizados refletirão os feixes de laser e o *scanner* mede as distâncias e ângulos, bem como calcula as coordenadas 3D de milhões de pontos de superfície (DENARDIN, 2013).

Um único exame com este *laser* consegue capturar todos os tipos possíveis de vestígios (biológicos, fibras, pêlos, dentre outros), com maior sensibilidade e eficácia que as diversas buscas com filtros convencionais com alterações típicas da fonte de luz alternativa (ALS), como é o caso das câmaras digitais. O fato de este novo tipo de *laser* ter um manuseamento fácil sem necessitar de grande experiência, significa que o local do crime pode ser elaborado muito rapidamente, com o mínimo de pessoal e um baixo orçamento (ESPÍNDULA, 2006).

A principal vantagem do *laser* sobre as ALS e outras fontes de luz é que as outras fontes emitem uma grande série de cores, já o *laser* emite toda a intensidade da sua luz em uma única cor. Além disso, com somente alguns Watts de potência, o *laser* pode dar resultados bem melhores do que uma lâmpada com um quilowatt de energia. Igualmente importante, é que se ultrapassa a necessidade de selecionar qual a cor e filtros a usar (VAZ, 2008).

3.7.3 Esfregaço vaginal e separação de células

Um esfregaço vaginal contendo uma mistura das células da vítima e do agressor seguida de uma violência sexual é um dos tipos mais frequentes de evidências biológicas em laboratórios de DNA forense (ZHAO et al., 2016).

Antes de aplicar a metodologia de tipagem de DNA humano, swabs retirados da vítima são esfregados em lâminas de vidro para a triagem de células de esperma através de microscopia óptica. A apresentação de esfregaços vaginas em lâminas de vidro não é um procedimento rotineiro para fins de tipagem de DNA em casos de estupro. Assim sendo, os swabs adicionais devem ser coletados da vítima como a possível fonte do material biológico do suspeito (SILVA et al., 2004).

Após a retirada de amostra de material por swab do trato genital da vítima, realizado o esfregaço vaginal, e confirmado se há, de fato, espermatozoides na amostra, passa-se então para a próxima etapa, que é a separação de células epiteliais da vítima e dos espermatozoides do agressor.

A cabeça do espermatozoide contém o núcleo do DNA usado para a tipagem de STR. Assim sendo, anticorpos que reconheçam, especificamente, a cabeça do espermatozoide, deveriam ser considerados prioridade para a captura de tais células. A microscopia eletrônica de transmissão e as experiências de rotulagem de padrões ouro imunológicos, mostraram que a PH-20 está localizada na membrana plasmática em toda a cabeça do espermatozoide humano, mas não nas partes média ou da cauda, o que o torna um alvo perfeito para isolar o esperma com DNA nuclear a partir de misturas celulares (BABA, 2002).

Para estabelecer esse método para o isolamento de esperma em um sistema biomagnético, um anticorpo anti-PH-20 é imobilizado em esferas magnéticas comerciais com ligações de amida covalente, e incubado com uma mistura de células simuladas contendo concentrações iguais de esperma e células epiteliais femininas. Após a incubação, são lavadas extensivamente e depois suspensas para observação microscópica. A microscopia óptica e a microscopia eletrônica de varredura confirmam que o IMB fica vinculado especificamente às cabeças dos espermatozoides intactos, e nenhuma célula epitelial é encontrada na suspensão (ZHAO et al., 2016).

Outra forma de separar as células epiteliais da vítima com os espermatozoides do agressor é, por exemplo, com anticorpos ACE. Com base em numerosos estudos sobre o isolamento de células tumorais únicas, a partir de uma ampla variedade de amostras iniciais com esferas magnéticas, foi iniciada a busca de um anticorpo anti-espermatozoide específico elevado. Alguns dos poucos anticorpos que podem cumprir esses critérios são anticorpos contra a isoforma testicular da enzima conversora da angiotensina (tACE). ACE é uma carboxi-dipeptidase dependente de zinco, que está presente em duas isoformas: uma forma somática e uma testicular. ACE testicular está localizada no pescoço, parte média e flagelos do espermatozoide (ASLINGER et al., 2007).

3.7.4 Extração do DNA

A extração de DNA é o primeiro passo para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular. Pode-se obter DNA a partir de inúmeros tipos de tecidos e células, e existe uma infinidade de protocolos para realização de tal procedimento. A escolha do protocolo de extração de DNA dependerá de

diversos fatores como: tipo de tecido a ser utilizado, grau de pureza e de integridade necessária para a aplicação em que o DNA será utilizado (PCR, sequenciamento, clonagem gênica, dentre outros) (GOUVEIA; REGITANO, 2007).

As técnicas de otimização de extração de DNA para utilização na reação em cadeia pela polimerase (PCR) permitem a investigação diagnóstica em diferentes amostras biológicas. Resquícios de gotas de esperma, e até mesmo de saliva, esfregaço bucal, sangue, bulbos capilares, tecidos incluídos em parafina, ossos, entre outros, podem fornecer informações importantes, desde que analisados de forma adequada (SIMONATO et al., 2007).

Basicamente, o processo de extração de DNA consiste em duas etapas. A primeira etapa é a extração propriamente dita e consiste no rompimento das membranas celulares e, conseqüente, exteriorização do DNA. A segunda fase consiste na purificação do DNA em solução, ou seja, “retirada” dos outros componentes celulares da solução (GOUVEIA; REGITANO, 2007).

Pesquisar métodos alternativos de extração de DNA que possam ser rápidos, práticos, livres de contaminação e de toxicidade e eficazes no que diz respeito à quantidade, qualidade e possibilidade de amplificação por PCR, do DNA extraído, pode possibilitar a aplicação da pesquisa em outros estudos, como diagnósticos retrospectivos, identificação de indivíduos, estudos populacionais, envios de amostras à distância e aplicações na Medicina Forense (BAREA; PARDINI; GUSHIKEN, 2004).

O rompimento das membranas celulares geralmente é feito com detergentes. A utilização de agentes caotrópicos como o tiocianato de guanidina impede o DNA de se ligar nas outras moléculas, facilitando sua separação na segunda fase do processo (GOUVEIA; REGITANO, 2007).

Os agentes caotrópicos são íons ou moléculas orgânicas pequenas que aumentam a solubilidade de substâncias apolares na água. Sua efetividade como desnaturantes é devida à sua habilidade em romper interações hidrofóbicas, embora seu mecanismo de ação ainda não esteja bem compreendido (VOET; VOET; PRATT, 2014).

Após a fase de rompimento das membranas celulares, deve-se separar o DNA dos outros componentes celulares. Isto é feito por meio da adição de substâncias que façam com que a solução se torne heterogênea e que o DNA fique dissolvido em apenas uma das fases. Após separar o DNA dos outros

componentes celulares, pode-se proceder uma precipitação do DNA para garantir a máxima pureza do material, esta precipitação geralmente faz-se utilizando etanol que, em presença de cátions monovalentes, promove uma transição estrutural na molécula de ácido nucléico, resultando em agregação e precipitação (GOUVEIA; REGITANO, 2007).

3.7.5 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Assim que identificado, separado e diferenciado os espermatozoides, a amostra será amplificada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de iniciadores com fluoróforos incorporados. Os produtos da amplificação serão posteriormente determinados por intermédio da separação em eletroforese capilar (LEITE, 2006).

Os laboratórios de ciência forense e tipagem de DNA foram bastante beneficiados com a descoberta de uma técnica conhecida como reação da polimerase em cadeia, ou PCR. Primeiramente descrita em 1985, por Kary Mullis e membros do grupo Human Genetic, a PCR revolucionou a biologia molecular através da habilidade de fazer milhares de cópias de uma específica sequência de DNA em questão de poucas horas. O impacto da PCR foi tanto, que o seu inventor, Kary Mullis, recebeu o prêmio Nobel de química em 1993, menos de dez anos depois de ter sido descrita pela primeira vez (BUTLER, 2012).

É uma técnica com alta especificidade e aplicabilidade, com centenas de métodos descritos. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de pouca quantidade de material. Esta técnica pode ser utilizada na realização de estudos de DNA obtidos a partir de material fixado em formol e embebidos em parafina, possibilitando assim o seu uso como técnica auxiliar no diagnóstico de rotina e a realização de estudos retrospectivos (MESQUITA et al., 2001).

A reação de PCR é realizada fazendo-se uso de variados reagentes que devem conter concentrações específicas para qualquer tipo de análise. Hoje em dia, existem vários *kits* de PCR que contêm todos os reativos pré-padronizados que facilitam a aplicação da PCR em laboratórios forenses. O reagente que vai conduzir o desenvolvimento de cada reação será o iniciador, que flanqueará a região do DNA a ser copiada, sendo um oligonucleotídeo sintetizado quimicamente e é incluído à reação em altas concentrações (LEITE et al. 2013).

A PCR é dividida em três etapas: desnaturação, hibridação e polimerização. A desnaturação ocorre quando a molécula de DNA é aquecida além da temperatura de 90 °C, para que as interações de hidrogênio da dupla hélice se quebrem, havendo a fragmentação das cadeias complementares. Após a desnaturação, ocorre a hibridação dos iniciadores, conectados a duas regiões: direto e reverso, a uma temperatura que varia de 45 a 72 °C e deve ser preliminarmente otimizada. Por fim, vem a polimerização onde a enzima *Taq* DNA polimerase catalisa a extensão da fita na direção 5' → 3', iniciando exatamente no iniciador e incluindo o devido nucleotídeo conforme o pareamento das bases nitrogenadas dispostas linearmente na cadeia de DNA molde (BUTLER, 2012).

3.7.6 Eletroforese Capilar

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico. A eletroforese capilar oferece outras vantagens sobre os métodos eletroforéticos convencionais, como o manuseio de volumes bastante reduzidos (1-10 ul) de amostra e a completa automação da análise, com possibilidade de injeção e detecção em fluxo. Outra vantagem é a compatibilidade com uma variedade de sistemas de detecção disponíveis para cromatografia líquida, como absorção no UV-VIS, fluorescência, métodos eletroquímicos, condutividade e espectrometria de massas, entre outros, que fazem da eletroforese capilar, uma técnica muito mais sensível e reprodutível que os métodos eletroforéticos empregando géis (TAVARES, 1995).

A eletroforese capilar é abundantemente aplicada e apresenta o mesmo princípio que a eletroforese em gel avaliados por laser, com a distinção de que contém capilares para a dissociação eletroforética dos fragmentos de DNA. As frações de DNA amplificadas por PCR são identificadas depois da eletroforese em gel de poliacrilamida, acompanhado da coloração com prata, ou pela identificação de sinal fluorescente, onde os iniciadores utilizados no PCR são marcados com fluorocromos, proporcionando a análise por sequenciador automático (LEITE et al. 2013).

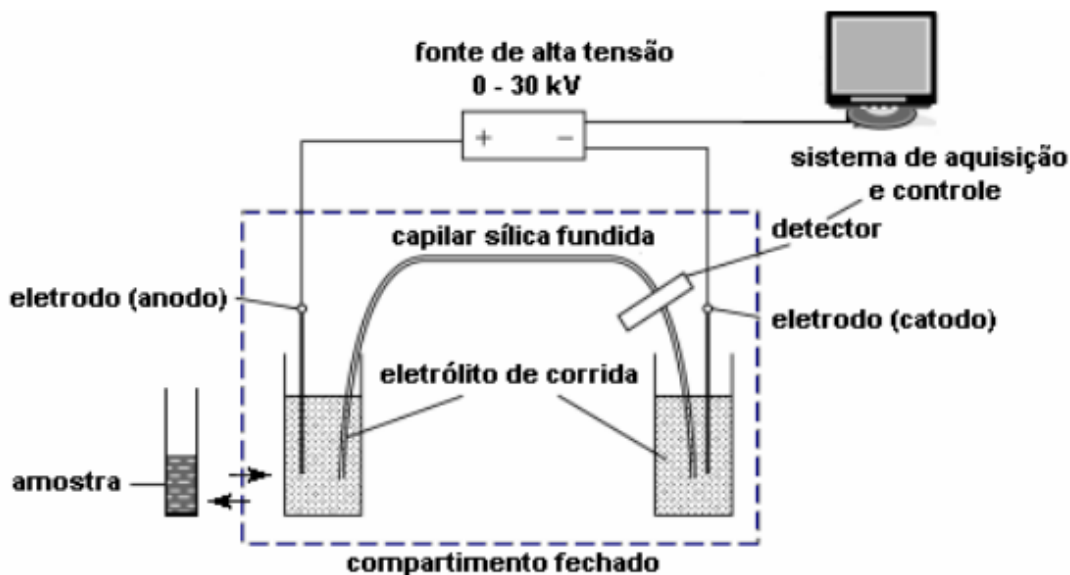
Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. O sistema compreende em uma fonte de alta tensão,

capilares (sílica fundida é o material mais comumente empregado), eletrodos (geralmente platina), e um detector apropriado. Uma fonte de alta tensão é utilizada para estipular um campo elétrico ao longo do capilar. Essas fontes podem, geralmente, ser operadas à voltagem constante ou corrente constante, com valores típicos de voltagem no intervalo de 0 – 50 kV e corrente de 0 – 200 uA. O operador é protegido contra um possível contato acidental com a alta voltagem pela inserção do sistema inteiro, ao menos o terminal de alta voltagem, em uma caixa de acrílico, equipada com chaves de segurança. A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos de platina, a dois reservatórios comportando uma solução de um eletrólito conveniente. Tubos capilares de sílica fundida são então ocupados com a solução e servem como canal de migração. As extremidades do capilar são submergidas nos reservatórios da solução para completar o contato elétrico. Para reduzir efeitos térmicos, o capilar deve ser conservado à temperatura constante. Há várias possibilidades para termostatização do sistema, envolvendo circulação de um líquido ou ar por intermédio de um cartucho contendo o capilar, além do uso de ventiladores e fornos (TAVARES, 1995).

É importante ressaltar que a eletroforese capilar é extensamente utilizada em análise de DNA forense, por permitir que grandes quantidades de amostras sejam examinadas de maneira automatizada, além de demandar de poucas quantidades de amostra para o processo de injeção e podendo ser facilmente reinjetadas, se preciso. A separação em eletroforese capilar é executada em menos de 1 hora, enquanto que aquela realizada em géis de poliacrilamida são necessárias muitas horas para se chegar à identificação humana. Além do tempo, a quantidade de etapas para a preparação do gel de acrilamida aumenta as chances de erros que possam vir a acontecer durante a manipulação. A desvantagem é o alto custo inicial para a compra dos equipamentos, onde aqueles empregados na eletroforese em gel de poliacrilamida são bem mais baratos (LEITE et al. 2013).

Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação. A figura 4 esquematiza um equipamento de eletroforese capilar, composto por uma fonte de alta tensão, capilares (normalmente de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina), um detector apropriado e um computador para o tratamento de dados (COSTA, 2008).

Figura 4 - Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar



Fonte: Costa (2008).

3.7.7 Microssatélites

Short tandem repeats (STR) ou microssatélites são unidades repetidas em tandem de 2 a 7 nucleotídeos e são abundantes no genoma humano. Os STRs triméricos e tetraméricos ocorrem cada 300 a 500 kb no cromossomo humano e parecem estar intercalados a essa frequência (aproximadamente 400 milhões de *loci*) em todo o genoma. Essas repetições podem ser amplificadas fielmente com a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitindo designações de alelos precisas em pesquisas populacionais com base em sua sequência de DNA. Aproximadamente 50% dos STRs estudados por grupos de identificação humana foram polimórficos. Os STR tetraméricos possuem características como efeitos negligenciáveis ou sem derrapagens (*slipage*) com fácil resolução de alelos consecutivos, tornando-os adequados para o mapeamento físico e genético do genoma humano, diagnóstico de doença e identificação pessoal em ciências médica e forense (KASHYAP et al., 2004).

Os microssatélites podem ser classificados de acordo com o tipo de repetição como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos. Microssatélites perfeitos consistem de um único motivo de repetição, não sendo

interrompidos ao longo da sequência repetida por nenhuma base que altere o padrão da repetição (por exemplo, CACACACACACACA). Microssatélites imperfeitos apresentam uma ou mais repetições que contém uma base que altera o padrão do motivo repetitivo (por exemplo, GAGAGAGACAGAGA). Microssatélites interrompidos apresentam a inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na estrutura da repetição (por exemplo, CACACACACAGGGCACACA). Microssatélites compostos consistem de dois ou mais microssatélites adjacentes com motivos repetitivos diferentes (por exemplo, CACACACAGATGATGATGATGAT) (SANTOS, 2003).

O DNA do cromossomo Y manifesta uma herança paterna, na forma haploide, ou seja, não expressa uma cópia homóloga, diferente do restante dos cromossomos. A única origem de variação nessa região é representada pelas mutações que se acumulam gradativamente com o tempo. O predomínio das mutações acontece nas regiões de íntrons e nas extragênicas. Deste modo, diz-se que o cromossomo Y contém uma marcação de todos os eventos mutacionais que aconteceram ao longo da história e proporciona a reorganização das linhagens paternas. O cromossomo Y possui uma região não recombinante, o qual contém diferentes tipos de polimorfismos que exibem taxas diferentes de mutações, proporcionando então, apurar o tipo de marcador mais apropriado para os variados tipos de estudos e abordagens. Analisando as regiões Y-específicas, pode-se chegar à revelação da genealogia paterna e as ligações evolutivas entre os diversos grupos de indivíduos (SCHWENGBER, 2008).

Os marcadores genéticos Y-STRs são de herança uniparental, ou seja, são passados dos pais aos seus herdeiros masculinos e estão localizados no cromossomo Y humano. A acessibilidade de protocolos robustos de tipagem de Y-STR viabiliza um útil instrumento para identificação masculina para estudos forenses. Polimorfismos do cromossomo Y-STRs são considerados de evolução rápida e geralmente são usados em estudos, onde são analisados os fenômenos populacionais recentes. Frequências haplotípicas estão envolvidas em análises estatísticas aplicadas no estudo do cromossomo Y, e não podem ser estimadas como produtos de repetições alélicas. Com isso, é de extrema importância genotipar cada indivíduo para o maior número de *loci* possíveis, fazendo assim, com que as linhagens sejam melhor discriminadas. Contrastados aos STRs autossômicos, a maioria dos STRs que são encontrados no cromossomo Y, expressa um menor grau de polimorfismo. Contudo, os Y-STRs regularmente

mostram diferenças marcantes nas distribuições das frequências alélicas entre grupos étnicos, diferente dos STRs autossômicos (SCHWENGBER, 2008).

3.7.8 Sequenciamento NGS

Next Generation Sequencing (NGS) ou, Sequenciamento de Nova Geração, foi utilizada de diversas maneiras para investigar facetas da biologia da cromatina, identificando *loci* genômicos que estão ligados por fatores de transcrição, ocupados por nucleossomos, acessíveis à clivagem de nuclease ou que interagem fisicamente com *locus* genômico remoto (MEYER; LIU, 2014).

O surgimento do sequenciamento de nova geração (NGS) revolucionou a genética e forneceu recursos valiosos para outras disciplinas científicas. À medida que NGS se torna mais acessível, o seu uso se estendeu para além da pesquisa básica e em contextos clínicos mais amplos (ROBASKY; LEWIS; CHURCH, 2014).

Essas novas tecnologias de sequenciamento, iniciaram sua comercialização em 2005 e rapidamente estão evoluindo. Todas essas tecnologias proporcionam o sequenciamento de DNA em plataformas que conseguem gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Dentre as novas plataformas de sequenciamento, duas já dispõem de ampla utilização em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina. Uma das características comuns dessas novas plataformas, é de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com um grande racionamento de tempo e custo por base para seu sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010).

As tecnologias de sequenciamento de nova geração foram aplicadas para mapear as posições de nucleossomos e outros determinantes da acessibilidade do DNA. Os nucleossomos são fatores importantes que afetam a regulação de genes e geralmente são associados à diminuição da acessibilidade do DNA às proteínas reguladoras. Mais comumente, os nucleossomos são identificados por clivagem preferencial do DNA ligante por nuclease microcócica (MNase). A identidade dos produtos de digestão MNase, revelada pela hibridação ou sequenciamento, marca a localização dos nucleossomos (MOROZOVA; MARRA, 2008).

A primeira plataforma de sequenciamento de nova geração a ser comercializada, foi o sistema 454. Essa plataforma exerce o pirosequenciamento, que é o sequenciamento baseado em síntese. A leitura da sequência nesse sistema é executada a partir de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, proveniente da inclusão de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, a enzima ATP sulfúrilase irá converter esse pirofosfato para ATP, sendo então usado pela luciferase, que irá oxidar a luciferina, ocasionando um sinal de luz que será capturado por uma câmera CCD (charge-coupled device) acoplada ao sistema (CARVALHO; SILVA, 2010).

A abordagem Illumina/Solexa alcança uma amplificação de DNA livre de clonagem, anexando fragmentos de DNA de cadeia simples a uma superfície sólida conhecida como uma matriz de moléculas únicas ou células de fluxo e realização de amplificação de ponte de fase sólida de modelos de DNA de uma única molécula. Neste processo, uma extremidade da molécula de DNA única é anexada a uma superfície sólida usando um adaptador; as moléculas subsequentemente se inclinam e se hibridam com adaptadores complementares, formando assim o modelo para a síntese de suas cadeias polinucleotídicas complementares. Após o passo de amplificação, é produzida uma célula de fluxo com mais de 40 milhões de aglomerados, em que cada conjunto é composto de aproximadamente 1000 cópias clonais de uma única molécula modelo. Os modelos são sequenciados de forma paralela, utilizando uma abordagem de sequenciamento por síntese de DNA que emprega terminadores reversíveis, com porções fluorescentes removíveis e polimerases de DNA especiais, que podem incorporar esses terminadores em cadeias de oligonucleotídeos crescentes (MOROZOVA; MARRA, 2008).

O sequenciamento de NGS em combinação com adaptações de protocolos experimentais estabelecidos aprofunda nossa compreensão da biologia da cromatina, incluindo a regulação de genes epigenéticos e pós-transcricionais, mecanismos subjacentes à diferenciação do desenvolvimento e reprogramação celular e o impacto da variação genética no fenótipo. À medida que os usos das tecnologias NGS e das próprias tecnologias evoluem, a detecção e a normalização do viés exigirão o desenvolvimento de métodos eficazes e flexíveis implementados em pacotes computacionais modulares eficientes (MEYER; LIU, 2014).

4. Considerações Finais

O estupro é um crime que deixa vestígios e com as técnicas certas e o devido treinamento da equipe pericial é possível chegar até o agressor. Várias técnicas foram desenvolvidas e aperfeiçoadas para que fique cada vez mais fácil para que os peritos consigam chegar a um resultado mais rápido e preciso.

A presença do sêmen na cena do crime ou resgatado da genitália da vítima é a principal prova de que de fato houve um estupro, e é preciso ter pelo menos um espermatozoide inteiro para que seja considerado sêmen e que possa ser feita a análise completa do vestígio. A partir disso, com as diversas técnicas que hoje são possíveis de serem realizadas graças ao avanço da tecnologia e da ciência, é possível detectar o vestígio e chegar a uma análise de DNA que seja conclusivo e identifique o culpado.

Vários trabalhos mostram a elevada incidência dos crimes sexuais em todo o mundo. As técnicas laboratoriais, na busca por evidências, estão cada vez mais modernas e seguras. Capacitar cada vez mais o perito para a busca de evidências na cena do crime e nos exames laboratoriais e métodos avançados de detecção de DNA, é uma condição importante para melhorar a segurança pública e a imagem da justiça. Com provas consistentes e que sejam realmente capazes de incriminar o suspeito, evita-se que os casos sejam arquivados, ou que a justiça absolva criminosos, devido à falta de provas.

Referências Bibliográficas

ANSLINGER, K. et al. Application of sperm-specific antibodies for the separation of sperm from cell mixtures. **Forensic science international Genetics Supplement Series**, New York, v.1, n.1, p.394–395, aug. 2008.

ARAÚJO, T. S.; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**. São Cristóvão, v.4, n.11, p.1-7, ago. 2008.

BABA, D. et al. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.277, n.33, p.30310–30314, aug. 2002.

BAREA, J. A.; PARDINI, M. I. M. C.; GUSHIKEN, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.26, n.4, p.274-281, 2004.

BENTO, A. Como fazer uma revisão da literatura: Considerações teóricas e práticas. **Revista JA (Associação Acadêmica da Universidade da Madeira)**, Funchal, n.65, ano VII, p.42-44. ISSN: 1647-8975, maio 2012.

BONACCORSO, N. S. **Aplicação do exame de DNA na elucidação de crimes**. 2005. 191f. Dissertação (Mestrado em Medicina Forense) – Faculdade de Direito da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2005.

BUTLER, J. M. **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology**. Editora Elsevier Inc, 1ª ed. Londres, 2012.

CARLSON, B. M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. Elsevier Editora Ltda, 5ª ed. Rio de Janeiro, 2014.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, mar. 2010.

CERQUEIRA, D.; COELHO, D. S. C. **Estupro no Brasil: uma radiografia segundo os dados da Saúde (versão preliminar)**. Brasília: IPEA, 2014.

CÉSAR, S. J.; SEZAR, S.; CALDINI, N. J. **Biologia**. Editora Saraiva, 6ª ed. Rio de Janeiro, 2015.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, Vila Velha – ES, v. 4, n. 1/2, p. 53-72, jan./dez. 2003.

COSTA, J. L. **Eletroforese capilar como ferramenta analítica para toxicologia forense**. 2008. 170f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

DENARDIN, A. **Proposta de procedimento para realização de reprodução simulada virtual dos fatos (RSF 3D)**. 2013. 189f. Dissertação (Mestrado em Design) – Escola de engenharia – Faculdade de arquitetura – Programa de pós-graduação em Design da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews. Genetics**, London, v.5, n.6, p. 435-445, jun. 2004.

ESPÍNDULA, A. **Perícia criminal e Cível**. Milenium Editora. 2ª ed. São Paulo, 2006.

GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriologia**. Artmed Editora Ltda, 3ª ed. Porto Alegre, 2012.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. Guanabara Koogan, 2ª ed. Rio de Janeiro, 2003.

GILL, P. et al. The evolution of DNA databases – Recommendations for new European STR loci. **Forensic Science International**, Limerick, v.156, n.2-3, p.242-244, jan., 2006.

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**, São Paulo, v.12/z 0, n.3, p.77-79, maio 2002.

GOUVEIA, J. J. S.; REGITANO, L. C. A. Extração de DNA. **Embrapa Pecuária Sudeste-Capítulo em livro técnico-científico (ALICE)**, 2007.

HUNG, L. Y. et al. An integrated microfluidic platform for rapid tumor cell isolation, counting and molecular diagnosis. **Biomedical Microdevices**, New York, v.15, n.2, p.339-352, abr. 2013.

KASHYAP, V. K. et al. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. **International Journal of Human Genetics**, Delhi, v.4, n.1, p.11-30, set. 2004.

LEITE, F. P. N. **Análise da estrutura genética da população do Rio Grande do Sul através de microssatélites autossômicos e de cromossomos sexuais**. 2006. 139 f. Tese (Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

LEITE, V. S. et al. **Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense**. 2013. 18f. Dissertação (Mestrado em Perícias Forenses) – Faculdade de Odontologia da Universidade de Pernambuco. Camaragibe, 2013.

LINDAUER, R. J. et al. The Amsterdam Sexual Abuse Case (ASAC) - study in day care centers: longitudinal effects of sexual abuse on infants and very young children and their parents, and the consequences of the persistence of abusive images on the internet. **BMC psychiatry**, London, v.8, n.14, p.295, nov. 2014.

MESQUITA, R. A. et al. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. São Paulo, v.15, n.4, p.314-319, out./dez. 2001.

MEYER, C. A.; LIU, X. S. Identifying and Mitigating Bias in Next-Generation Sequencing Methods for Chromatin Biology. **Nature Reviews Genetics**, London, v.15, n.11, p.709-721, nov. 2014.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. Elsevier Editora Ltda, 8ª ed. Rio de Janeiro, 2008.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, Vancouver, v.92, n.5, p.255-264, nov. 2008.

ROBASKY, K.; LEWIS, N. E.; CHURCH, G. M. The Role of Replicates for Error Mitigation in Next-Generation Sequencing. **Nature Reviews Genetics**, London, v.15, n.1, p.56-62, jan. 2014.

ROGRIGUES, F. S. et al. Estimativa da taxa de mutação de 15 locos autossômicos de microssatélites na população de Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 8, n. 2, p. 159-163, abr./jun. 2010.

SALADIN, K. **Anatomy and Physiology**. Editora McGraw Hill, 2ª ed. Nova Iorque, 2002.

SANTOS, M. L. B. **Isolamento e caracterização de microssatélites do genoma de *Echinococcus granulosus* (Cestoda, Taeniidae)**. 2003. 85f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

SCHWENGBER, S. P. **Utilização de marcadores de cromossomo Y como ferramenta visando a elucidação de casos de crimes sexuais na genética forense**. 2008. 50 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – Pontífice Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2008.

SILVA, D. A. et al. DNA typing from vaginal smear slides in suspected rape cases. **São Paulo medical jornal (Revista Paulista de Medicina)**. São Paulo, v.122, n.2, p.70-72, jul. 2004.

SIMONATO, L. E. et al. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v.43, n.2, p.121-127, abr. 2007.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, mar./abr. 1996.

THIBODDEAU, G. A.; PATTON, K. A. **Estrutura e Funções do Corpo Humano**. Editora Manole Ltda, 11ª ed., Barueri – SP, 2002.

VAZ, J. A. **Metodologias de detecção de vestígios biológicos forenses**. 2008. 135f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) – Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro. Aveiro, 2008.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Artmed Editora Ltda, 4ª ed. São Paulo, 2014.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n.1, p.1-16, jan. 2002.

ZHAO, X. C. et al. Isolating Sperm from Cell Mixtures Using Magnetic Beads Coupled with an Anti-PH-20 Antibody for Forensic DNA Analysis. **Plos One**, San Francisco, v.11, n.7, jul. 2016.