



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES**  
**GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

**AMANDA BARBOSA MACHADO**

**O USO DO DNA MITOCONDRIAL NA ANÁLISE FORENSE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do certificado de conclusão do curso de Biomedicina, do Centro Universitário de Brasília - UniCEUB, sob orientação do Prof. Paulo Roberto Martins Queiroz.

**BRASÍLIA**

**2016**

O uso do DNA mitocondrial na análise forense.

AMANDA BARBOSA MACHADO <sup>1</sup>

PAULO ROBERTO MARTINS QUEIROZ<sup>2</sup>

## Resumo

Desde a sua introdução, em meados de 1980, o teste de DNA forense tem desempenhado um papel importante na comunidade de justiça auxiliando na convicção de culpados e exoneração de inocentes. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão bibliográfica no formato narrativa sobre o uso do DNA mitocondrial como uma ferramenta importante para utilização forense. O mtDNA representa apenas em torno de 1% do DNA total das células, porém tende a acumular mais mutações do que o DNA nuclear. Em 1984, quando o primeiro perfil de DNA foi produzido, os progressos da análise de DNA foram admiráveis: ficaram mais sensíveis, precisos, rápidos e com um menor custo. No futuro, espera-se que as técnicas de biologia molecular sejam aprimoradas e que novos e melhores métodos sejam desenvolvidos, a fim de que a maioria dos casos de investigações forenses tenham um desfecho que não possa ser questionado nos tribunais.

**Palavras-chave:** DNA forense, justiça, revisão, DNA mitocondrial, perfil, tribunais.

The use of mitochondrial DNA in forensic analysis.

## Abstract

Since its introduction in mid-1980, the forensic DNA testing has played an important role in the justice community assisting in the conviction of guilty and exoneration of the innocent. The objective of this work was to make a literature review in narrative format on the use of mitochondrial DNA as an important tool for forensic use. The mtDNA is only around 1% of total cell DNA, but tends to accumulate more mutations than nuclear DNA. In 1984, when the first DNA profile was produced, DNA analysis of the progress has been remarkable: they were more sensitive, accurate, fast and with lower costs. In the future, it is expected that molecular biology techniques are improved and that new and improved methods are developed, so that most cases of forensic investigations have an endpoint that can not be questioned in court.

**Keywords:** Forensic DNA, justice, review, mitochondrial DNA, profile, court.

---

<sup>1</sup> Graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

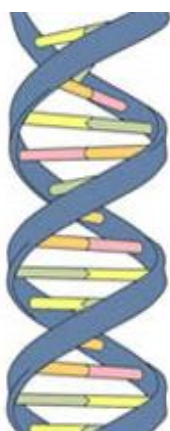
<sup>2</sup> Doutor em Biologia Animal – UNB. Professor do curso de Biomedicina do UniCEUB.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a sua introdução, em meados de 1980, o teste de DNA (ácido desoxirribonucleico) forense tem desempenhado um papel importante na comunidade de justiça auxiliando na convicção de culpados e exoneração de inocentes. A recuperação de vestígios de DNA da cena do crime é de importância crucial para reconstruir e resolver crimes, além de fornecer provas objetivas ao sistema criminal (BUTLER, 2015a).

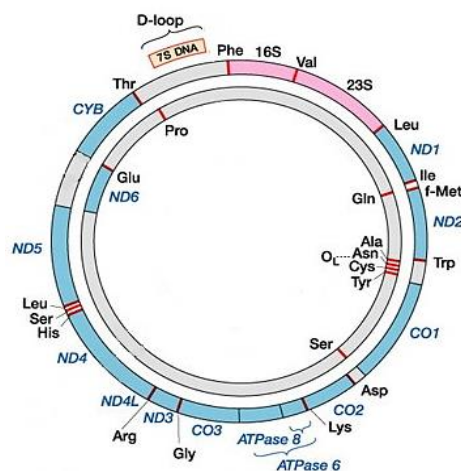
Há dois tipos de DNA nas células humanas, sendo que um deles pode ser encontrado nos cromossomos do núcleo (DNA nuclear) e o outro nas mitocôndrias (DNA mitocondrial). O DNA nuclear possui uma molécula linear, com cerca de 3,2 bilhões de pares de bases e o DNA mitocondrial é uma molécula de forma circular e com dupla fita, com mais de 16.000 pares de bases (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013), que estão representados nas figuras à seguir.

Figura 1. Molécula de DNA nuclear



Fonte: Sterky e Lundeberg (2000)

Figura 2. Molécula de DNA mitocondrial



Fonte: Sprouse (2014)

A análise do DNA mitocondrial (mtDNA) pode ser empregada quando restos degradados de amostras são encontradas no tratamento de casos forenses ou casos de identificação humana e também em situações em que um indivíduo está em falta ou incapaz de fornecer uma amostra biológica e um parente materno vivo está disponível para fornecer a amostra de mtDNA necessárias para fins de comparação (HOLLAND; HOLLAND; MELTON, 2012). Se tratando de amostras biológicas muito velhas e em alto estado de degradação, sua análise é mais eficaz, já tendo sido utilizada para

identificar vítimas de casos arquivados, desastres em massa (tsunami e terremotos), casos historicamente importantes (guerras) e casos com material biológico limitado (TEMPLETON, 2013).

Sua análise evoluiu para se tornar uma parte indispensável e de rotina do tratamento de casos forenses modernos, empregando técnicas extremamente sensíveis para analisar cada material. Suspeitos podem ser ligados a cenas de crime, ou de uma cena de crime para outra, usando provas de DNA a partir de tão pouco quanto a saliva em uma ponta de cigarro ou as células da pele em um volante (JOBLING; GILL, 2004).

A utilização deste DNA possui quatro principais vantagens sobre o DNA nuclear: (1) milhares de cópias de mtDNA estão presentes em uma célula em comparação com duas cópias do DNA nuclear, levando a maior sensibilidade; (2) mtDNA é herdado da mãe, permitindo parentes maternos distantes serem comparados com as amostras analisadas para o teste de hipóteses ou relacionamento quando o fornecedor original da amostra não está disponível; (3) o mtDNA é mais estável a ação de agentes ambientais; (4) pode-se conseguir uma quantidade maior deste DNA mesmo se a amostra é limitada e se está em um alto nível de degradação (MELTON, 2005).

Muitas técnicas podem ser usadas hoje em dia para analisar a molécula de DNA, dentre elas estão: Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) que foi um dos primeiros métodos forenses utilizados e necessita de uma grande amostra de DNA; Sequenciamento do DNA, onde é determinada a ordem dos nucleotídeos (HARRIS, 2001). Eletroforese de DNA em gel, que é utilizada para identificar, quantificar e purificar fragmentos de ácidos nucleicos resultando na separação com base no tamanho. Reação em cadeia da polimerase (PCR) que é a mais utilizada na análise de mtDNA pois consegue trabalhar com quantidades muito pequenas do mesmo e amplifica sequências específicas (BUCHOLTZ; DAVIS, 2011).

As vantagens da PCR incluem a sua velocidade, sensibilidade, e também a capacidade de processar muitas amostras ao mesmo tempo além de tornar possível levantar um perfil de DNA a partir de uma pequena gota de sangue, cabelo, ossos, dentes, saliva, ou sêmen (BUTLER, 2010).

Além disso, o mtDNA tem se revelado uma importante ferramenta molecular para estudos a respeito da ancestralidade humana. Ele apresenta características que possibilitam o acúmulo sequencial, ou seja, cronológico, das mutações ocorridas ao longo da evolução da humanidade. Assim, as mutações exclusivas de uma população

habitando um continente específico ou de uma população possibilitam aos pesquisadores estudar a história de formação e as relações entre as populações humanas (GONÇALVES, 2007).

Os avanços na compreensão genética e nas técnicas laboratoriais fizeram das evidências de DNA uma ferramenta valiosa no sistema de justiça criminal e que também têm incentivado o interesse público (HARRIS, 2001).

O objetivo deste trabalho é apresentar o uso do DNA mitocondrial como uma ferramenta importante para utilização forense.

## **2 METODOLOGIA**

O presente trabalho consiste em uma revisão bibliográfica no formato narrativo que é caracterizado por publicações amplas, adequadas para discutir e descrever o desenvolvimento de um determinado assunto, através de um ponto de vista teórico ou contextual (ROTHER, 2007).

Foram utilizadas fontes eletrônicas de dados bibliográficos nacionais e internacionais como PubMed, Bireme, EBSCO, Science Direct e a base do “Journal of Forensic Sciences”, por meio de consulta pelas palavras-chave: “DNA forense” (*forensic dna*), “DNA mitocondrial” (*mitochondrial dna*), “forense” (*forensic*), “PCR-RFLP”, “biologia molecular” (*molecular biology*), “investigação criminal” (*criminal investigation*), “haplogrupos humanos” (*human haplogroups*), “herança materna” (*maternal inheritance*) e “polimorfismo” (*polymorphism*). As palavras chave foram utilizadas duas a duas ou três a três com o auxílio do conector “AND”. Além disso, também foram obtidos artigos nas referências bibliográficas dos trabalhos encontrados.

O foco principal foram artigos escritos em português, inglês e espanhol, com delimitação de tempo entre os anos de 2000 a 2016, porém também foram utilizados trabalhos clássicos e conceituais publicados antes desse período (1998 e 1987).

## **3 DESENVOLVIMENTO**

### ***3.1 DNA mitocondrial***

As moléculas de DNA que compõem o genoma humano estão localizadas dentro do núcleo de cada célula. No entanto, há um genoma pequeno e circular encontrado dentro da mitocôndria, a organela produtora de energia celular, que reside no

citoplasma. O número de moléculas de DNA mitocondrial (mtDNA) dentro de uma célula pode variar consideravelmente. Em média existem 4-5 cópias por mitocôndria, porém, cada célula pode conter centenas de mitocôndrias fazendo esse número chegar a 1.000 em cada uma. É esta amplificação de moléculas de mtDNA em cada célula que permite maior sucesso com amostras biológicas que podem ter sido danificadas com calor ou umidade (BUTLER, 2005).

O mtDNA representa apenas em torno de 1% do DNA total das células, porém tende a acumular mais mutações do que o DNA nuclear, devido à sua proximidade com a cadeia respiratória onde são produzidas espécies reativas de oxigênio (BUCKLETON, 2014).

### ***3.2 Estrutura e composição***

O DNA mitocondrial possui uma cadeia dupla com aproximadamente 16.569 pares de bases e possui 37 genes que codificam para produtos utilizados no processo de fosforilação oxidativa ou produção de energia celular. Há também uma região controle de 1122pb que contém a origem de replicação para uma das vertentes do mtDNA, mas não codifica para quaisquer produtos de genes e é, portanto, referida às vezes como região “não-codificante”. O número total de nucleotídeos no genoma mitocondrial pode variar devido às pequenas mutações que são inserções ou exclusões. Os 37 genes transcritos de mtDNA encontrados na “região codificante” incluem 13 proteínas, 2 RNAs ribossomais (rRNA; 16S e 12S) e 22 RNAs transportadores (tRNA) (BUTLER, 2005).

A estrutura e organização do gene de mtDNA é altamente conservada entre mamíferos. As cadeias duplas desse DNA podem ser diferenciadas com base na distribuição assimétrica de guanina e citosina que resulta em uma diferente densidade de flutuação de cada cadeia e permite sua separação (pesada e leve). A composição geral da base é de 44% (G + C), sendo a cadeia pesada rica em guaninas e a cadeia leve rica em citosinas. A maioria das informações são codificadas na cadeia pesada (H), com os genes para dois rRNAs, 14 tRNAs e 12 polipeptídios. A cadeia leve (L) codifica para 8 tRNAs e um único polipeptídio (STRACHAN; READ, 2011).



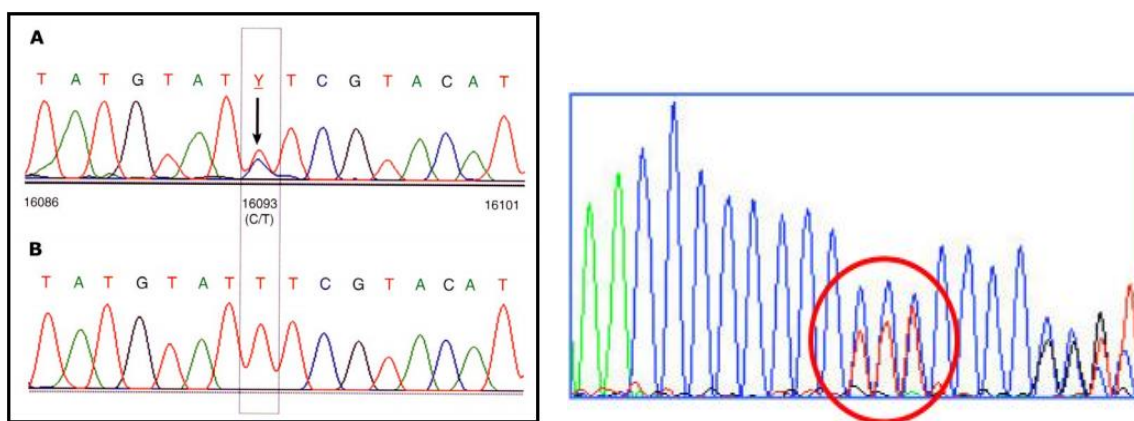
têm sido muito úteis no estudo da evolução de eucariotos e, mais especificamente, das populações humanas. Ao contrário do DNA nuclear, o mtDNA é herdado da mãe. Com exceção das mutações, a sequência de mtDNA de irmãos e todos os parentes maternos é idêntica, sendo uma característica útil em casos forenses, tais como, analisar os restos de uma pessoa desaparecida, uma vez que, os parentes maternos conhecidos podem fornecer amostras de referência para comparação direta com o tipo mtDNA questionado (HAGELBERG et al., 2000).

A baixa fidelidade da DNA polimerase do mtDNA e a aparente falta de mecanismos de reparo são responsáveis por uma maior taxa de mutação nessa molécula. Algumas regiões parecem evoluir taxas de mutação 5-10 vezes mais do que a dos genes nucleares de cópia única. Estas regiões são de interesse para testes de identidade humana devido à sua conseqüente hipervariabilidade (HELGASON et al., 2001).

A existência de inúmeros mtDNAs por célula pode gerar a heteroplasmia, ou seja, a coexistência de dois ou mais genomas mitocondriais diferentes em uma célula ou tecido do mesmo indivíduo, podendo ser de sequência (posições diferenciadas dos nucleotídeos) ou de comprimento (quando ocorrem deleções ou inserções de bases nitrogenadas) (MELTON, 2005; HJORT et al., 2010).

Abaixo, estão representadas as heteroplasmias de sequência e de comprimento quando visualizadas por meio de um cromatograma.

Figura 4. Heteroplasmias de sequência e comprimento.



Fonte: Butler (2005).

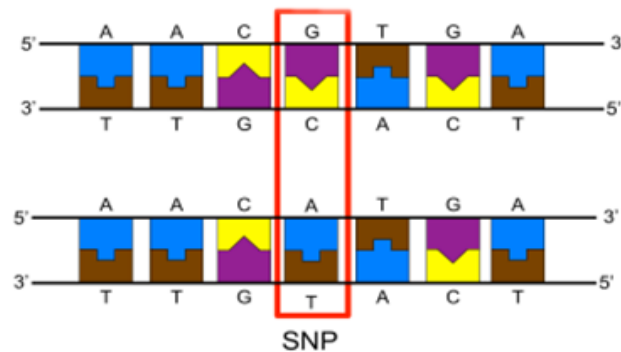
A variabilidade genética entre os indivíduos é gerada pela sequência de bases presentes no DNA que, apesar de serem apenas quatro, podem combinar-se formando

milhões de sequências diferentes. No genoma humano podem ocorrer variações no DNA entre indivíduos que se designam por polimorfismos (BUTLER, 2010).

Dentre os existentes destaca-se o Polimorfismo de Nucleotídeo Simples (SNPs) que define-se como uma variação estável na sequência de DNA, que ocorre quando um único nucleotídeo – A, T, C, ou G – no genoma difere entre sequências homólogas, quer devido a alterações de bases ou por inserção ou deleção de uma ou poucas bases (FUCHS; PODDA, 2005).

Em seguida, na imagem é possível observar esta alteração característica do DNA mitocondrial.

Figura 5. Representação de um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP).



Fonte: Luftig e Richey (2001)

Essas substituições (transições) nucleotídicas são em sua maioria: 65% entre purinas (Guanina e Adenina) ou entre pirimidinas (Citosina e Timina), enquanto os outros 35% ocorrem entre uma purina e uma pirimidina (transversões) (MARTINO; MANCUSO; ROSSI, 2010).

Os SNPs são encontrados em regiões codificadoras e, principalmente, não-codificantes. SNPs nas regiões codificadoras podem alterar a estrutura da proteína traduzida por essa região de codificação, como também, podem não provocar nenhuma mudança (MOROVVATI; MOROVVATI; RANJBAR, 2011).

Podem ser caracterizados como marcadores moleculares quando ocorrem em mais de 1% da população, pois quando essas variações são relatadas com uma frequência menor que este valor, são consideradas apenas como mutações pontuais (MAAGAARD, et. al. 2006).

A abundância de SNPs e a facilidade com que eles podem ser medidos fazem estas variações genéticas significativas. Uma de suas vantagens é que exigem

fragmentos de DNA extremamente pequenos e, em função disso, sua análise pode ser bem sucedida com as amostras que são demasiadamente degradadas nas quais se recuperou pouco material biológico, tornando-o um marcador de grande interesse para a análise forense (HOUCK, 2015).

### ***3.4 Herança materna***

Em questões de herança, o mtDNA é inteiramente materno pois no processo de fecundação quando o espermatozóide fertiliza o óvulo, só levará sua cabeça deixando seu corpo para trás, e é na peça intermediária do corpo que estão todas as mitocôndrias paternas, logo, o embrião desenvolvido terá em suas células mitocôndrias formadas a partir das que estavam presentes no ovócito II, ou seja, mitocôndrias iguais às da mãe, e estando localizado fora do núcleo das células, não está sujeito a recombinação genética durante a meiose (SATO; SATO, 2013).

O mtDNA também pode determinar o grau de parentesco nas populações atuais e, conseqüentemente, a antiguidade relativa de cada ramo populacional. Usando seu número de polimorfismos e levando em conta suas taxas de mutação, pode ser utilizado como relógio biológico (MACHADO, 2010).

### ***3.5 Eva mitocondrial***

O melhor modelo de reconstrução da evolução a partir do mtDNA foi realizado em 1º de janeiro de 1987 sob autoria de Rebecca Cann, Mark Stoneking, e Allan C. Wilson. Foi produzido um artigo científico no qual esses três cientistas divulgaram que todos os seres humanos modernos poderiam traçar sua ascendência de volta para uma única mulher que viveu 200.000 anos atrás na África. Esta mulher foi apelidada de "Eva" (também conhecida como "Eva mitocondrial") (HARRUB; THOMPSON, 2003).

Como o mtDNA ocorre em quantidades relativamente pequenas e, uma vez que, os pesquisadores queriam a maior amostra possível de cada pessoa, eles decidiram usar placentas humanas como fonte do mtDNA. Foram selecionadas 147 mulheres grávidas de várias origens geográficas: 20 africanas, 34 asiáticas, 46 caucasianas, 21 aborígenes australianas, e 26 aborígenes da Nova Guiné. Com base no estudo de RFLPs, ou seja, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, foram elaboradas árvores filogenéticas que apontaram para um único ancestral comum africano de ambos os ramos (CANN; STONEKING; WILSON, 1987).

À medida que os cientistas consideravam várias populações humanas, os africanos pareciam mostrar uma variação genética muito maior do que os não-africanos (ou seja, asiáticos, europeus, americanos nativos das ilhas do Pacífico). De acordo com os biólogos moleculares, este aumento da variabilidade é o resultado de populações africanas serem mais velhas, portanto, terem tido mais tempo para acumular mutações e divergirem um do outro. Este pressuposto que levou os pesquisadores a postular que a África era o antigo "berço da civilização" a partir do qual toda a humanidade havia emergido (WILLIAMS, 2002).

Tendo concluído que o grupo Africano era o mais velho, os pesquisadores queriam descobrir o quão velho o grupo poderia ser. Para isso, usaram o "relógio molecular" que, neste caso, foi baseado em mutações no mtDNA. A taxa à qual o relógio marcou foi determinada a partir da acumulação de alterações ao longo de um determinado período de tempo (MORRIS, 2000).

Em primeiro lugar, eles compararam o mtDNA dos seres humanos com o de chimpanzés, e então usaram paleontologia e dados moleculares adicionais para determinar a idade do ancestral comum. Este revelou uma taxa de mutação na faixa de 2% a 4% por milhão de anos. Em segundo lugar, eles compararam os grupos em seu estudo que estavam perto geograficamente e tomaram a idade do ancestral comum desde os tempos estimados. Mais uma vez o resultado foi de 2% a 4% a cada milhão de anos (RODRIGUEZ-TRELLES; TARRIO; AYALA, 2001).

Tendo o ancestral mitocondrial comum divergido de todos os outros por 0,57%, ela deve ter vivido em aproximadamente 200.000 anos atrás (HARRUB; THOMPSON, 2003). No entanto, isso não significa que ela foi a primeira mulher moderna, mas sim indica que apenas seus descendentes sobrevivem até os dias atuais (PARRY, 2010).

### ***3.6 Haplogrupos***

Neste longo período de tempo, conforme a espécie humana emigrou da África e ocupou diferentes regiões da terra, ocorreram mutações consecutivas no DNA mitocondrial, originando diferenças geográficas nas linhagens do mtDNA. Mutações ocorridas em certa região geográfica tornaram-se marcadores da origem da matrilinearidade naquela determinada região. Apesar de cada matrilinearidade ser caracterizada por um haplótipo distinto, elas possuem características e distribuições

geográficas em comum, possibilitando serem reunidas em grupos de haplótipos que recebem o nome de haplogrupos (ALVES-SILVA et al., 2000).

Sendo assim, as linhagens de mtDNA de todo o mundo dividem-se em quatro conjuntos, os haplogrupos L0, L1, L2 e L3. A primeira linhagem a se ramificar a partir da Eva mitocondrial foi L0. Este haplogrupo é encontrado em altas proporções entre a África do Sul e África Oriental. Os haplogrupos L1 e L2 são especificamente africanos, enquanto L3 pertence ao continente africano, porém deu origem a dois haplogrupos que se dispersaram pelo mundo inteiro e pode ser subdividido em haplogrupos característicos de populações africanas, ameríndias, asiáticas, australianas e europeias (BROWN, 1998).

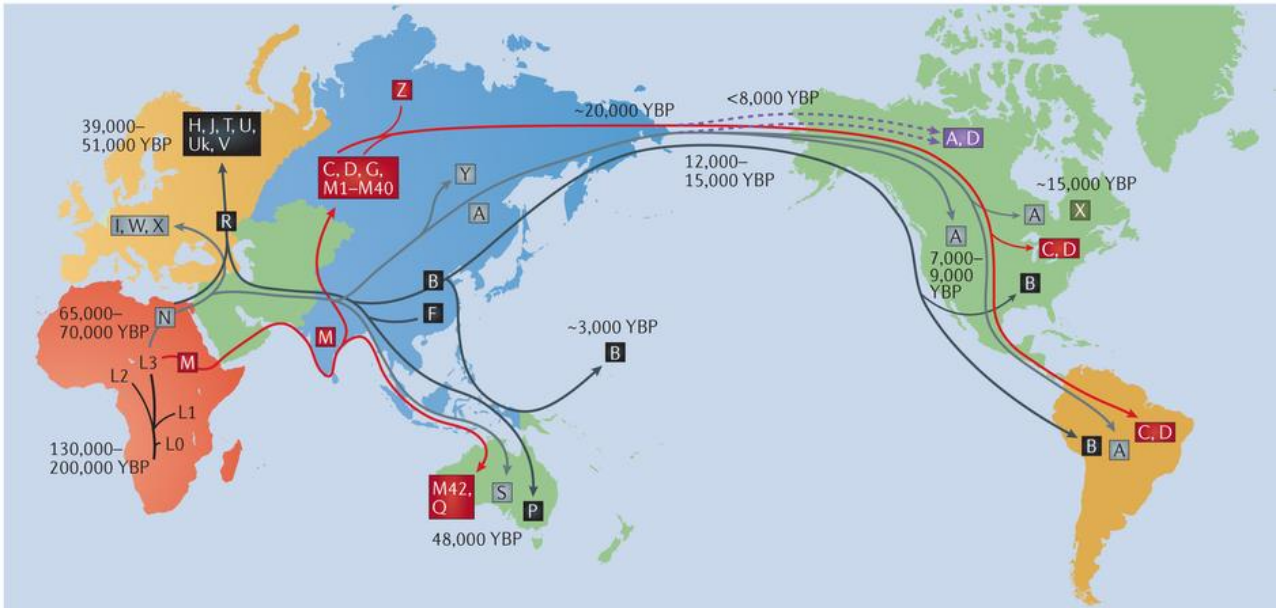
Os haplogrupos M e N, representam as linhagens do resto do mundo fora da África, descendem de L3, sendo que esta possui cerca de 84.000 anos de idade. Alguns pesquisadores acreditam que apenas algumas pessoas deixaram a África em uma única migração que passou a povoar o resto do mundo, com base no fato de que apenas descendentes de L3 são encontradas fora da África (GROUCUTT, et. al. 2015).

Com a migração dos seres humanos, enquanto o haplogrupo N foi direcionado para a Eurásia e Américas, linhagens do haplogrupo M foram para a Ásia, Austrália e também para o continente Americano dando origem aos haplogrupos C, D, G, Q e Z (ELSON, 2001). Na Europa, o haplogrupo N deu origem a maioria dos haplogrupos, sendo estes: X, W e I característicos da Europa, F pertencendo à Ásia, S e P à Austrália S, A e B que compreendem as Américas. Além de R, que é a raiz dos haplogrupos europeus H, J, K, T, U, V, que surgiram por volta de 39.000-51.000 anos atrás (STEWART; CHINNERY, 2015).

Os estudos do seqüenciamento genômico de mtDNA identificaram muitos sub-haplogrupos diferentes que definem a árvore filogenética contemporânea (WALLACE; CHALKIA, 2013).

Abaixo na figura 2 pode se perceber o fluxo de migração humano, juntamente com os determinados haplogrupos, desde 200.000 anos atrás.

Figura 6. Migrações da população humana e principais haplogrupos do mtDNA



Fonte: STEWART e CHINNERY (2015).

A tabela seguinte retrata os haplogrupos, observados na figura anterior, de acordo com sua linhagem.

Tabela 1. Haplogrupos mitocondriais relacionados com suas respectivas linhagens.

Haplogrupo	Linhagem
L0, L1, L2, L3	Africanos
A, B, C, D	Ameríndeos
H, I, J, K, N, R, T, U, V, W, X	Europeus
A, B, C, D, F, M, N, R, Z	Asiáticos
S, P, Q	Australianos

Fonte: Autora.

### 3.7 Técnicas de identificação mitocondrial

A habilidade de analisar e recuperar mínimas quantidades de DNA de algum material biológico revolucionou a ciência forense. Em 1984, quando o primeiro perfil de DNA foi produzido, os progressos da análise de DNA foram admiráveis: ficaram mais sensíveis, precisos, rápidos e com um menor custo (CICV, 2010).

As tecnologias utilizadas para a realização da análise forense de DNA diferem na sua capacidade de se diferenciar dois indivíduos e na velocidade com que os

resultados podem ser obtidos. Inúmeros avanços têm sido feitos nos últimos 15 anos em termos de velocidade de processamento da amostra e sensibilidade. Testes de DNA que anteriormente necessitavam de 6 a 8 semanas, agora podem ser realizados em poucas horas e ao invés de exigir grandes manchas de sangue com DNA bem preservado, pequenas quantidades de amostra, tão pouco como uma única célula, em alguns casos, pode produzir um perfil útil de DNA (BUTLER, 2005).

Antes da análise, é necessário extrair o DNA a partir da amostra. Isto é feito por meio dos seguintes passos: As células da amostra são lisadas em solução tampão; Proteínas desnaturadas e lipídeos são removidos por meio de centrifugação; A amostra é então passada através de uma coluna, contendo uma resina com carga positiva que se liga ao DNA; Proteínas contaminantes, lipídeos e sais são, em seguida, removidos por meio de várias lavagens; O DNA é recuperado numa solução tampão (VERDON; MITCHELL; OORSCHOT, 2013).

A forma mais comum de análise forense do mtDNA é chamada PCR-RFLP (Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) onde duas técnicas distintas são utilizadas em conjunto. Em primeiro lugar, a PCR irá gerar milhares a milhões de cópias de uma determinada seção de DNA a partir de uma quantidade muito pequena do mesmo. Para que a reação aconteça são necessários:

- molde de DNA a ser copiado;
- iniciadores, trechos curtos de DNA que iniciam a reação de PCR, destinados a ligarem-se a ambos os lados da seção de DNA que se pretende copiar;
- bases nucleotídicas A (adenina), C (citosina), T (timina) e G (guanina) são necessárias para construir a nova cadeia de DNA;
- enzima Taq polimerase para adicionar nas novas bases de DNA;
- solução tampão para atenuar a variação dos valores de pH (ácido ou básico), mantendo-os aproximadamente constantes, pois a reação necessita de um meio constante (GENOME, 2016).

A PCR envolve um processo de aquecimento e resfriamento chamado ciclo térmico, que é realizado por uma máquina. A técnica exige três fases principais:

1. Desnaturação - quando a cadeia dupla do DNA é aquecida a 90-95°C para separá-lo em duas cadeias simples;

2. Anelamento - quando a temperatura é diminuída até 55-60°C para permitir que os primers de DNA se liguem ao DNA molde;
3. Extensão - quando a temperatura é novamente elevada até 75°C e a nova cadeia de DNA é feita pela enzima Taq polimerase (AVASHIA; GARIBYAN, 2013).

Após o DNA ter sido amplificado, será submetido ao método de Polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) onde uma enzima de restrição, que cortará o DNA numa sequência específica, é usada para quebrá-lo em pequenos pedaços. O tamanho dos pedaços é distinto com base na localização dentro do DNA das sequências específicas. Assim, um perfil de restrição para o DNA de uma pessoa em particular pode ser gerado. Uma vez que o DNA de cada pessoa contém pequenas diferenças, uma mudança em um destes locais de restrição resultaria em um perfil diferente dos fragmentos de restrição (BUCHOLTZ; DAVIS, 2011).

Esses fragmentos de distintos tamanhos serão separados e visualizados através da eletroforese em gel, na forma de bandas. Estes, serão colocados em um gel de agarose e expostos à cargas elétricas diferentes, sendo uma extremidade com carga positiva e a outra com carga negativa. As moléculas serão estimuladas para que migrem de acordo com seu tamanho e conseqüentemente os fragmentos menores migrarão mais rápido que os maiores (ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004).

Outra técnica em que o mtDNA se aplica é a de sequenciamento de DNA, cujo processo determina a disposição dos nucleotídeos ao longo de um fragmento do mesmo. A técnica mais utilizada em questões forenses é a de Terminação da Cadeia, criada por Fred Sanger e colaboradores em 1978, pois é a que gera dados mais facilmente interpretados (KOCH; ANDRADE, 2008).

A metodologia se baseia em adicionar a um tubo: o DNA a ser sequenciado, os primers, taq DNA polimerase, nucleotídeos dNTPs (bases A, C, T, G), nucleotídeos ddNTPs que são nucleotídeos A, C, T, G quimicamente modificados e marcados com fluorocromos de cores diferentes. Os dNTPs possuem terminal hidroxila no carbono 3 que permite que um novo nucleotídeo seja inserido para formação da cadeia (estende a fita de DNA). Já os ddNTPs não têm terminal hidroxila, portanto não possibilitam a inserção de um novo nucleotídeo (fim da síntese) (RABBANI; TEKIN; MAHDIEH, 2014).

A reação de sequenciação é iniciada com o aquecimento da mistura, o que faz com que as cadeias do molde de DNA se separem e em seguida, a temperatura é

reduzida, permitindo que o iniciador encontre o seu complemento no DNA molde. A temperatura é elevada uma última vez de modo que a enzima DNA polimerase possa ligar-se ao DNA e incorporar os nucleotídeos adequados (METZKER, 2010).

A sequência complementar vai sendo construída com a adição dos nucleotídeos normais e a medida que um ddNTP for incorporado, é bloqueada a continuação da complementaridade da cadeia, ou seja, a sequência se encerra nesse nucleotídeo marcado (GENOME, 2016).

Ao final da reação de sequenciamento, haverá milhões de fragmentos de tamanhos diferentes, cujo último nucleotídeo marcado de cada fragmento, difere de um para o outro (ROSS et al., 2013).

Estes produtos finais são visualizados pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, que permite a visualização de moléculas de DNA que diferem de tamanho por um único nucleotídeo (KREMKOW; LEE, 2015).

Cada tubo é depositado em um poço diferente e a corrente elétrica é aplicada fazendo com que os fragmentos migrem. Cada banda no gel, corresponde a uma versão específica de uma das bases terminadoras que foi adicionada (A, C, G ou T). Por fim o DNA marcado radioativamente é então visualizado por exposição do gel ao filme de raios-X, sendo a leitura da sequência feita a partir do fundo do mesmo (KAYSER, 2015).

### ***3.8 Aplicações forenses***

A identificação humana por meio do mtDNA constitui um dos produtos mais revolucionários da Genética Moderna. Em menos de 20 anos tornou-se uma ferramenta indispensável na investigação criminal, sendo aceita rotineiramente em processos judiciais no mundo todo (HILL, 2008).

Ao coletar amostras para análise forense, os seguintes princípios devem ser rigorosamente respeitados: evitar a contaminação, usando luvas em todo o manuseio; manipular de forma adequada, assegurando que as amostras são embaladas, armazenadas e transportadas corretamente; rotular com precisão para que todos os materiais sejam claramente identificados com o tipo de amostra, bem como a data e hora da coleta; garantir a segurança das amostras para ter certeza que não serão passíveis de adulteração; manter a continuidade, isto é, uma vez que um espécime foi coletado, seu manuseio posterior deve ser registrado, havendo detalhes da transferência entre os indivíduos (FRANÇA, 2014).

Os profissionais forenses examinam as propriedades físicas, óticas e químicas dos vestígios de provas e usam uma variedade de ferramentas para encontrar e recolher as evidências residuais, como por exemplo: pinças, fitas, aspiradores especializados, swabs, fontes de luz alternativas e lasers (LAPOINTE, 2015).

A preservação do local de crime constitui-se em garantir a sua integridade para a colheita dos vestígios que auxiliarão no esclarecimento da dinâmica dos fatos e é a primeira providência a ser tomada por policiais e peritos, a fim de que o mesmo permaneça sem alteração, possibilitando, um levantamento pericial eficaz (GARCIA, 2002).

Os vestígios constituem-se em qualquer marca, objeto ou sinal que possa ter relação com o ocorrido, logo, o vestígio que, após analisado pela perícia, apresentar relação direta com o fato investigado, torna-se uma evidência (MAPES; KLOOSTERMAN; POOT, 2015).

Em se tratando de perícia, o foco principal do profissional forense é estabelecer uma conexão indiscutível entre o suspeito e a cena do crime, ou descartar o envolvimento do mesmo. As técnicas empregadas permitem que seja possível identificar, com relativa precisão, se uma pessoa esteve ou não no local a partir de uma pequena gota de sangue, ou então um fio de cabelo encontrado no local (BERGSLIEN, 2006).

As condições e disposição das diversas amostras biológicas no local possibilitam reconstituir com exatidão e segurança a dinâmica do evento criminal derivada da atividade pericial forense, no que se refere: a identificação de suspeitos em casos de crimes sexuais; identificação de cadáveres carbonizados e em decomposição; identificação de cadáveres mutilados; estabelecimento de relação entre instrumento(s) lesivo(s) e vítima(s), e estudo de vínculos genéticos (BUTLER, 2015b).

Há uma variedade de possíveis fontes de provas de DNA que podem ser utilizadas para determinar um perfil, que inclui sangue, sêmen, saliva, urina, pêlos, dentes, ossos e células. Os investigadores também podem coletar itens que poderiam ter sido tocados ou utilizados por pessoas envolvidas em determinado crime (RITTER, 2008).

A respeito de cada amostra que pode ser encontrada na cena de crime:

### *Células epiteliais*

Presentes em roupas, pontas de cigarro, sob unhas da vítima e/ou agressor, garrafas de água; podem ser coletadas pelo uso de fita ou por esfregação (GOODWIN; LINACRE; HADI, 2007).

### *Sangue*

Indício mais habitual; formação de poças, gotas, salpicaduras, manchas ou crostas; ajuda na individualização do indivíduo; revela a forma como foi depositado na cena; se as manchas não são visíveis, podem ser utilizadas luz ultravioleta e/ou reações químicas (MONTEIRO, 2010).

### *Saliva*

Amostra relativamente simples; pequenas quantidades permitem extrair DNA para comparação; presença detectada por meio de utilização de luz ultravioleta; coleta por esfregaços (GUNN, 2009).

### *Pêlos*

Pode-se distinguir se é proveniente de um animal ou de um indivíduo; sendo humano, permite diferenciar se é da vítima ou de um possível agressor; revela a possível raça do indivíduo e de que parte do corpo é proveniente; coleta por pinças e armazenamento em envelopes de papel, selados (MARANO, 2010).

### *Sêmen*

Estabelece ou anula ligações sobre determinados suspeitos de crime; pode ser detectada mesmo depois de anos, sob luz ultravioleta; detecção feita por meio de esfregação com swab umedecido contendo solução ácida; caso seja uma mancha, deve ser seca, ao ar livre, e colocada em envelopes de papel (FRUMKIN, 2010).

### *Urina*

Presença de células de revestimento da uretra; Coleta por meio de seringa ou pipeta; armazenada sob refrigeração até o momento da análise (MONTEIRO, 2010).

### *Ossos e dentes*

Ossos logo têm muita medula como fonte de DNA; DNA também pode ser extraído de dentes; amostras não devem ser secas; envio ao laboratório sem qualquer conservante (KAYSER, 2011).

Dependendo da quantidade de amostra e do nível de degradação da mesma, várias técnicas podem ser aplicadas para reduzir ou aumentar a probabilidade de um indivíduo em particular estar presente em um local de crime. Uma vantagem adicional destes testes de DNA é a capacidade de avaliar casos anteriores que foram decididos principalmente com base na tecnologia mais antiga (LIMA, 2007).

Se, chegando ao final de todo o processo forense, for possível responder às perguntas pertencentes ao Heptâmero de Quintiliano: Quem? O que? Onde? Com que auxílio? Por quê? De que maneira? e Quando? é sinal de que o trabalho pericial foi executado com sucesso e que a justiça será feita (COBLE, et. al. 2009).

A seguir são apresentados casos em que se utilizou a análise do DNA mitocondrial.

### **Vítimas do 11 de setembro em NY**

A análise dos SNPs foi utilizada para trabalhos de identificação das vítimas dos ataques terroristas ao World Trade Center, em 11 setembro de 2001. Foi recolhido um total de 21.817 restos humanos, como resultado da fragmentação dos corpos de muitas pessoas. Para a realização das análises, as salas utilizadas para esse fim não eram acessíveis, para evitar riscos de contaminação (MARCHI, 2004).

### **O caso da família real Russa**

O primeiro caso histórico de investigação criminal com uso de DNA foi realizado em 1994, quando ossos, supostamente pertencentes à família real russa (Romanov), executada na Revolução Bolshevik, em 1918, foram analisados usando sequenciamento de DNA mitocondrial. As amostras possuíam mais de 70 anos e as sequências de mtDNA coincidiam com as de parentes matrilineares: Príncipe Philip e Duque de Edinburgh, coincidiam com a suposta Czarina e suas filhas, enquanto que as sequências oriundas do Duque de Fife e da Princesa Xênia Cheremeteff-Sfiri

coincidiam com o suposto Czar Nicholas II, exceto por uma discrepância em uma das bases. A clonagem em PCR do mtDNA do suposto Czar mostrou duas moléculas diferentes e foi concluído ser um exemplo de heteroplasmia. Em outra análise independente, realizada pelo laboratório de DNA das Forças Armadas em Rockville, Maryland, em 1996, em restos do irmão Czar, Georgij Romanov, descobriu-se que ele possui uma heteroplasmia na mesma posição no mtDNA, dissipando efetivamente qualquer dúvida sobre a identificação da família. Após considerarem todos os fatos, as autoridades russas pronunciaram que aqueles restos pertenciam aos Romanov (JOBBLING; GILL, 2004).

### **Exoneração de William Gregory**

William Gregory foi preso, acusado e condenado pela tentativa de estupro de uma mulher em seu complexo de apartamentos após a vítima tê-lo identificado dentre uma gama de suspeitos. Não houveram evidências, exceto por seis fios de cabelo descobertos em uma meia-calça, usada como máscara, retirada do apartamento da vítima. No julgamento de 1993, uma microscopia de cabelo afirmou que os pêlos poderiam ter vindo de Gregory, e este testemunho foi suficiente para a acusação. Porém, em testes pós-condenação, realizados em 2000, mostravam que os fios de cabelo partilhavam o mesmo perfil de DNA mitocondrial entre si, mas possuíam um perfil diferente do de Gregory e da vítima. Ele foi libertado da prisão logo após o teste. Este caso foi o primeiro dos Estados Unidos ao ajudar em uma exoneração (MELTON, 2005).

## **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O DNA mitocondrial possui papel fundamental no contexto da análise forense e apresenta importantes vantagens quando comparado ao DNA nuclear por vários motivos: possui regiões polimórficas únicas que permitem sua individualização; os descendentes recebem esse DNA apenas da mãe, o que permite traçar a linhagem materna de uma pessoa; e é mais resistente à degradação que o DNA nuclear, além de estar presente em várias cópias por célula.

Com o aumento de atentados terroristas, acidentes em massa, crimes de difícil solução e de pessoas desaparecidas, o uso das análises com mtDNA tem sido extremamente necessárias, tornando-as cada vez mais úteis e eficazes.

Contudo, nos tempos atuais, séries como “CSI: Crime Scene Investigation” dão a impressão de que os laboratórios criminais de hoje em dia estão bem equipados, com profissionais altamente treinados e tecnologia de ponta à disposição, fazendo com que os resultados das análises fiquem prontos em pouco tempo, o que é uma grande fantasia. No Brasil, por exemplo, ainda há um longo caminho a se percorrer em busca da equiparação aos padrões internacionais de qualidade para as ciências forenses. É preciso estabelecer rigorosos padrões de qualidade e possuir um alto investimento em suporte material em todo o país, porém, além de tudo, a situação nacional ainda é marcada pela pouca disponibilidade de profissionais treinados.

É necessária uma maior preocupação das autoridades a cerca desse assunto pois o mesmo traz um maior interesse público em fazer justiça.

No futuro, espera-se que as técnicas sejam aprimoradas e que novos e melhores métodos sejam desenvolvidos, a fim de que a maioria dos casos de investigações forenses não permita colocar em dúvida a admissibilidade dos dados, tendo um desfecho que não possa ser questionado nos tribunais.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-SILVA, J. et. al. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages, **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 67, n. 2, p. 444-461, 2000.

ANTONINI, S. R. C; MENEGHIN, S. P; URASHIMA, A. S. **Técnicas básicas de biologia molecular**. Araras: UFSCar. 2004.

AVASHIA, N; GARIBYAN, L. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR), **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 133, n. 3, p. 1-4, 2013.

BERGSLIEN, E. Teaching To Avoid the “CSI Effect”, **Journal Of Chemical Education**, Washington, v. 83, n. 5, p. 690-691, 2006.

BORGES-OSÓRIO, M. R; ROBINSON, W. M. **Genética Humana**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013.

BROWN, M. D. et al. "mtDNA Haplogroup X: An Ancient Link between Europe/Western Asia and North America?", **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 63, n. 6, p. 1852-1861, 1998.

BUCHOLTZ, A; DAVIS, A. **Forensic Studies: CSI for the Non scientist: From crime scene to crime lab**. San Clemente: Law Tech Publishing Group, 2011.

BUCKLETON, J. et. al. Helping formulate propositions in forensic DNA analysis, **Science and justice**, v. 54, n. 4, p. 258-261, 2014.

BUDOWLE, B. et. al. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations, **Annual review of genomics and human genetics**, Palo Alto, v. 4, p 119-141, 2003.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers**. 2. ed. USA: Elsevier, 2005.

BUTLER, J. M. **Fundamentals of Forensic DNA Typing**. San Diego: ELSEVIER, 2010.

BUTLER, J. M. The future of forensic DNA analysis. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, London, v. 370, n. 1674, p. 1-10, aug. 2015a.

BUTLER, J. M. U.S. initiatives to strengthen forensic science & international standards in forensic DNA, **International Society for Forensic Genetics**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 4-20, 2015b.

CANN, R. L; STONEKING, M; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and Human Evolution, **Nature**, London, v. 325, p. 31-36, jan. 1987.

CICARELLI, R. Detetives de dna. **Unesp Ciência**, São Paulo, n. 14, p. 32-35, nov. 2010.

CICV. **Pessoas desaparecidas, análise de dna e identificação de restos mortais**. Disponível em: <[www.cicr.org](http://www.cicr.org)>. Acesso em: 23 abr. 2016.

COBLE, M. D. et al. Mystery solved: the identification of the two missing Romanov children using DNA analysis. **PLos One**, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2009.

ELSON, J. L. et al. Analysis of European mtDNAs for recombination, **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 68, n. 1, p. 145–153, jan. 2001.

FRANÇA, G. V. **Medicina Legal**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

FRUMKIN, D. et. al. Authentication of forensic DNA samples, **Forensic Science International Genetics**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 95-103, 2010.

FUCHS, J; PODDA, M. **Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics**. 1. ed. New York: CRC Press, 2005.

- GARCIA, I. E. **Inquérito – Procedimento Policial**. 9. ed. Goiânia: AB Editora. 2002.
- GENOME. **Discover more about DNA, genes and genomes, and the implications for our health and society**. Cambridge, 2016. Disponível: <<http://www.yourgenome.org>>. Acesso em: 16 mai. 2016.
- GENOME. **What is PCR (polymerase chain reaction)?** United Kingdom, 2016. Disponível em: <<http://www.yourgenome.org>>. Acesso em: 16 jun. 2016.
- GONÇALVES, V. F. **O uso do DNA mitocondrial em quatro estudos envolvendo a ancestralidade de populações americanas nativas e miscigenadas**. 2007. Dissertação (Doutorado) do Programa de Bioquímica e Imunologia do ICB, Minas Gerais, 2007.
- GOODWIN, W; LINACRE, A; HADI, S. **An introduction to Forensic Genetics**. 2. ed. New Delhi: Wiley, 2007.
- GROUCUTT, H. S. et. al. Rethinking the dispersal of Homo sapiens out of Africa, **Evolutionary Anthropology**, Durham, v. 24, n. 4, p. 149–164, 2015.
- GUNN, A. **Essential Forensic Biology**. 2. ed. UK: Wiley-blackwell, 2009.
- HAGELBERG, E. et. al. Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia, **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 267, p. 1595-1596, 2000.
- HARRIS, W. How DNA Evidence Works, **How Stuff Works Science**, EUA, jan. 2001. Disponível em: <<http://science.howstuffworks.com/life/genetic/dna-evidence.htm>> Acesso em: 11 out. 2015.
- HARRUB, B; THOMPSON, B. The Demise of Mitochondrial Eve, **Apologetics Press**, USA, 2003. Disponível em: <<http://www.apologeticspress.org>>. Acesso em: 14 abr. 2016.
- HELGASON, A. et. al. mtDNA and the Islands of the North Atlantic: Estimating the Proportions of Norse and Gaelic Ancestry, **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 68, n. 3, p. 723-737, mar. 2001.
- HILL, C. R. et al. Characterization of 26 miniSTR loci for improved analysis of degraded DNA samples, **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 73-80, jan. 2008.
- HJORT, K. et. al. Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes, **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, London, v. 365, n 1541, p. 713-727, 2010.
- HOUCK, M. M. et. al. A Review of Forensic Science Management Literature. **Forensic science review**, Taipei, v. 27, n. 1, p. 53-68, 2015.

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

JORDE, L. B et. al. The distribution of human genetic diversity: A comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data, **The American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 66, n. 3, p. 979-988, mar. 2000.

KAYSER, M. Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes, **International Society for Forensic Genetics**, Amsterdam, v. 18, n. 6, p. 33-48, 2015.

KAYSER, M. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. **Forensic Science International: Genetics**, London, v. 12, n. 3, p. 179-192, 2011.

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

KREMKOW, B. G; LEE, K. H. Sequencing technologies for animal cell culture research, **Biotechnology letters**, Netherlands, v. 37, n. 1, p. 55-65, 2015.

LAPOINTE, M. Leading-edge forensic DNA analyses and the necessity of including crime scene investigators, police officers and technicians in a DNA elimination database, **International Society for Forensic Genetics**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 50-55, 2015.

LIMA, H. B. DNA x Criminalidade. **Revista Perícia Federal**, Brasília, v. 9, n. 26, p. 8-11, 2007.

LUFTIG, M. A; RICHEY S. DNA and Forensic Science, **New England Law Review**, Boston, v. 35, n. 3, p. 609-613, 2001.

MAAGAARD, A. et. al. Mitochondrial (mt)DNA changes in tissue may not be reflected by depletion of mtDNA in peripheral blood mononuclear cells in HIV-infected patients, **International Society for Antiviral Research**, London, v. 11, n. 5, p. 601-608, 2006.

MACHADO, R. B. **Vestígios do passado**: A história ameríndia revelada através de marcadores genéticos. 155 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MAPES, A; KLOOSTERMAN, A. D; POOT, C. J. DNA in the Criminal Justice System: The DNA Success Story in Perspective, **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v. 60, n. 4, p. 851-856, 2015.

MARANO, L. A. et al. Polimorfismos genéticos e identificação humana: o DNA como prova forense. **Genética na Escola**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 1, p. 53-56, 2010.

MARCHI, E. Methods Developed to Identify Victims of the World Trade Center Disaster, **American Laboratory**, San Francisco, v. 36, n. 3, p. 30-36, 2004.

MARTINO, A; MANCUSO, T; ROSSI, A. M. Application of High-Resolution Melting to Large-Scale, High-Throughput SNP Genotyping: A Comparison with the TaqMan Method, **Journal of Biomolecular Screening**, Larchmont, v. 15, n. 6, p. 623-629, 2010.

MELTON T; HOLLAND C; HOLLAND M. Forensic mitochondrial DNA analysis: Current practice and future potential, **Forensic Science Review**, Taipei, v. 24, n. 2, p. 101-122, jul. 2012.

MELTON, T. et. al. Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs, **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v. 50, n. 1, p.73-80, 2005.

MELTON, T. Mitochondrial DNA Heteroplasmy, **Forensic Science Review**, Taipei, v. 16, n. 1, p. 1-20, 2005.

METZKER, M. L. Sequencing technologies - the next generation, **Nature reviews genetics**, London, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MONTEIRO, I. V. P. **Vestígios Hemáticos no local de crime sua importância Médico-Legal**. 2010. 141 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Medicina Legal, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, Porto, 2010.

MOROVVATI, S; MOROVVATI, Z; RANJBAR, R. Detecting Rare Triple Heteroplasmic Substitutions in the Mitochondrial DNA Control Region: A Potential Concern for Forensic DNA Studies, **Cell Journal**, Tehran, v. 13, n. 2, p. 103-106, 2011.

MORRIS, A. A; LIGHTOWLERS R. N. Can Paternal mtDNA be Inherited, **The Lancet**, Philadelphia, v. 355, n. 9212, p. 1290-1291, 2000.

PARRY, W. Age confirmed for 'Eve,' mother of all humans, **Live Science**, New York, aug. 2010. Disponível em: <http://www.livescience.com/>. Acesso em: 02 mar. 2016.

RABBANI, B; TEKIN, M; MAHDIEH, N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics, **Journal of Human Genetics**, Tokyo, v. 59, n. 1, p. 5-15, 2014.

RITTER, N. DNA Solves Property Crimes (But Are We Ready for That?), **National Institute of Justice Journal**, Washington, n. 261, p. 140-154, 2008.

RODRIGUEZ-TRELLES, F; TARRIO, R; AYALA, F. J. Erratic over dispersion of three molecular clocks: GPDH, SOD, and XDH, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 20, p. 11405-11410, 2001.

ROSS, M. G. et. al. Characterizing and measuring bias in sequence data, **Genome biology**, London, v. 14, n. 5, p. 40-51, 2013.

ROTHER, E. T. Revisão sistemática X revisão narrativa, **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. V-VI, jun. 2007.

SATO, M; SATO, K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA, **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1833, n. 8, p. 1979-1984, 2013.

SPROUSE, M. L. et. al. Internal Validation of Human Mitochondrial DNA Quantification Using Real-Time PCR, **Journal of Forensic Sciences**, Chicago, v. 59, n. 4, p. 1049-1056, jul. 2014.

STERKY, F; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes, **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 76, n. 1, p. 1-31, 2000.

STEWART, J. B; CHINNERY, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease, **Nature Reviews Genetics**, London, v. 16, n. 9, p. 530–542, 2015.

STRACHAN, T; READ, A. **Human Molecular Genetics**. 4. ed. New York: Garland Science, 2011.

TEMPLETON, J. E. et. al. DNA capture and next-generation sequencing can recover whole mitochondrial genomes from highly degraded samples for human identification, **Investigative Genetics**, v. 4, n. 1, p. 26, 2013.

VERDON, T. J; MITCHELL, R. J; OORSCHOT, R. A. H. The influence of substrate on DNA transfer and extraction efficiency, **International Society for Forensic Genetics**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 167-175, 2013.

WALLACE, D. C; CHALKIA, D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 5, n. 11, p. 1-47, 2013.

WILLIAMS, R. S. Another Surprise from the Mitochondrial Genome, **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 347, n. 8, p. 609-612, 2002.