Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics 6(1):84-107 (2016)

Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics

Journal homepage: www.ipebj.com.br/forensicjournal

Importância do DNA em Investigações Forenses: Análise de DNA Mitocondrial

DNA Importance in Forensic Investigations: Mitochondrial DNA Analysis

Letícia Batista Pinto[1], Isamara G. Cavalcanti Caputo[2], Margaret Mitiko Inada Pereira[2]

[1] *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil*

[2] *Instituto Paulista de Estudos Bioéticos e Jurídicos (IPEBJ), Ribeirão Preto, SP, Brasil*

Received 19 September 2016

Resumo. O DNA pode ser utilizado como ferramenta em qualquer investigação criminal, é um vestígio capaz de ligar pessoas e objetos à cena do crime com um alto grau de confiabilidade, além de ser de extrema importância na identificação humana e de restos mortais. Apesar de a descoberta do DNA não ter sido recente, e seu uso mesmo na área forense já acontecer a alguns anos, podemos perceber que as pesquisas nesse ramo não cessaram, e existem infinitas possibilidades para aprimoramento de técnicas e dos métodos utilizados hoje em dia. O DNA mitocondrial (mtDNA) pode ser uma ótima alternativa na tipagem de DNA quando o DNA nuclear está disponível em pequenas quantidades, degradado ou contaminado e a possibilidade de realizar testes com o DNA nuclear é pequena. Devido ao maior número de cópias de mtDNA por célula, e ao fato deste DNA ser circular, e presente dentro de uma organela com membrana celular dupla, o mtDNA possui certa proteção quanto ao grau de degradação. Além disso, o mtDNA é capaz de ligar pessoas à sua linhagem materna, já que este possui herança exclusivamente materna. Com a revisão realizada nesse trabalho podemos perceber que há uma grande tendência em analisar e sequenciar o genoma mitocondrial inteiro, e não só as regiões não-codificantes como anteriormente, desse modo tem surgido diversas metodologias capazes de realizar esta análise, mas ainda não foi estabelecida uma metodologia ouro para a análise em questão. Podemos perceber também que tem se despendido esforços no sentido de encontrar e analisar as heteroplasmias presentes no mtDNA devido a sua capacidade de

http://dx.doi.org/10.17063/bjfs6(1)y201684

ajudar na identificação. Apesar da análise de mtDNA ainda não ser empregada em larga escala nos laboratórios de rotina forense, este é um assunto que tem sido amplamente estudado pela comunidade científica e este endossamento no conhecimento do assunto é sempre benéfico, podendo ajudar na implementação de novos métodos, no barateamento do uso destas análises e na criação de *kits* que possam ser amplamente utilizados.
Palavras-chave: mtDNA; Identificação humana; Ciências forenses; Investigação criminal; Genética Forense.

Abstract. The DNA can be used as a tool in any criminal investigation, it is a vestige capable to connect people and objects to the crime scene with a high degree of reliability, as well as being extremely important for human identification and identification of human remains. Although the discovery of DNA was not recent, and its use even in the forensic area is already happening a few years, we can see that research in this field have not ceased, and there are endless possibilities for improving techniques and methods used today. Mitochondrial DNA (mtDNA) can be a good alternative for DNA typing when the nuclear DNA is available in small amounts, degraded or contaminated and the possibility of conducting tests with this DNA is smaller. Due to the higher number of copies of mtDNA per cell, and the fact that this DNA is circular, and this within an organelle with double cell membrane, mtDNA has some protection on the degree of degradation. In addition, mtDNA is able to connect people to their maternal lineage, since it has only maternal inheritance. With the review we could see that there is a great tendency to analyze and sequence the entire mitochondrial genome, and not only the non-coding regions as before, thus it has arisen several methodologies able to perform this analysis, but has not been established a gold methodology for the analysis in question. We can also notice that has been expended efforts to find and analyze the heteroplasmias present in the mtDNA due to its ability to help in identification. Although mtDNA analysis is not yet used on a large scale in forensic routine laboratories, this is a subject that has been widely studied by the scientific community and this endorsement on the subject of knowledge is always beneficial and can help implement new methods, the cheapening of the use of these tests and the creation of kits that can be widely used.
Keywords: mtDNA; Human identification; Forensic sciences; Criminal investigation; Forensic Genetics.

1. Introdução

Em genética forense dois tipos de DNA podem ser utilizados para investigações de amostras biológicas humanas ou vestígios, o DNA nuclear e/ou o DNA mitocondrial (mtDNA)[1]. A análise da sequência de mtDNA humano está sendo amplamente

utilizada para caracterizar amostras biológicas forenses, principalmente quando o DNA nuclear das amostras é insuficiente para tipagem. Fios de cabelo, ossos, dentes e outras amostras que estão extremamente decompostas podem ser sujeitas a análise de mtDNA. O controle de qualidade e as diretrizes de interpretação utilizados no DNA nuclear com base em análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) também se aplicam em análises de mtDNA, porém existem algumas características do mtDNA que merecem uma atenção especial: este possui herança materna, heteroplasmia (que é basicamente a presença de uma mistura de mais do que um tipo de genoma mitocondrial numa mesma célula, ou em diferentes células do organismo) e maior sensibilidade de detecção de mtDNA na tipagem[2].

Existem diferenças se compararmos o DNA nuclear com o mtDNA, o DNA mitocondrial é extracromossômico, ou seja, é separado e distinto do genoma nuclear. Uma célula possui entre 200 e 1700 cópias de mtDNA de modo que este está presente em um número de cópias por célula muito maior do que o DNA nuclear, o que significa que o mtDNA tem uma maior probabilidade de permanecer intacto, do que o DNA nuclear, perante aos processos de degradação. No entanto, a presença de muitas centenas de cópias do mtDNA por célula, juntamente com a sua elevada taxa de mutação cria o potencial para heteroplasmia. O mtDNA é pequeno, com cerca de 16,5 kb, circular, herdado da linhagem materna, e geralmente, não sofre recombinação. O mtDNA possui 37 genes que codificam produtos utilizados no processo de fosforilação oxidativa ou na produção de energia celular. Há também uma região de controle com 1122 pb que contém a origem de replicação para uma das cadeias de mtDNA, mas não codifica produtos de genes e, portanto, é referida como região não codificante. Apesar das diferenças entre o DNA nuclear e o mtDNA os testes de perfil genético realizados são basicamente os mesmos e muitos procedimentos são iguais, assim como o uso de PCR[2,3,4].

Para fins forenses e de identificação humana, o mtDNA é considerado como sendo herdado estritamente da linhagem materna. No momento da concepção, o núcleo do espermatozoide entra no óvulo e funde-se diretamente com o seu núcleo, de modo que na fertilização os espermatozoides não contribuem com qualquer componente citoplasmático[3].

Uma sequência de mtDNA, excluindo possíveis mutações, é idêntica em todos os familiares maternalmente ligados. Esta característica de herança materna possui relevância forense, pois, pode confirmar ou refutar a identidade de amostras

perante comparação com amostras de referência de parentes maternos conhecidos. Em geral, a transmissão de um tipo de mtDNA é consistente ao longo de muitas gerações, de modo que relações entre várias gerações podem ser avaliadas por tipagem do mtDNA[2].

Como o mtDNA é herdado da linhagem materna, este é essencialmente monoclonal nos indivíduos, no entanto, é possível que mais do que um tipo de mtDNA esteja presente num mesmo indivíduo, devido a heteroplasmia. A ocorrência de heteroplasmia não impede o uso de mtDNA para análise forense. Sua existência é confirmada se duas bases, na mesma posição, em ambas as cadeias do DNA diferem da cadeia de referência[2].

Outra aplicação das mutações do mtDNA na área forense envolve *haplogrupos*, que são mutações particulares, bem estabelecidas, amplamente distribuídas entre os indivíduos das populações. Estudos de polimorfismos do mtDNA com fragmentos de restrição de uma ampla variedade de populações humanas revelaram conjuntos de mutações ancestrais que definem estes *haplogroupos* e, por causa da herança uniparental, evoluíram de forma independente um do outro. Cada um desses *haplogrupos* (mais de 20 *haplogrupos* são conhecidos entre populações humanas), que incluem tipos de mtDNA evolutivamente relacionados, é definido por conjuntos específicos de mutações associadas, permitindo assim uma classificação rápida e precisa das moléculas de mtDNA dentro de uma determinada população[5].

Esta distribuição filogeográfica dos haplogrupos de mtDNA é uma ferramenta útil nas ciências forenses para determinar a origem geográfica dos indivíduos, já que 35% das mutações são específicas dos continentes [5].

Análises de DNA mitocondrial em casos forenses envolvem tipicamente materiais onde pouco DNA íntegro está presente, como dentes, cabelos e ossos (costelas e ossos longos, por exemplo, fêmur e úmero), os quais são muitas vezes a única amostra possível para a análise. O DNA mitocondrial deve ser cuidadosamente extraído e purificado longe de inibidores de PCR que podem estar presentes na amostra. Adicionalmente a isso deve-se tomar cuidado ao extrair material de ossos e dentes para não prejudicar as análises antropológicas e odontológicas respectivamente[3].

Fios de cabelo são muitas vezes fontes de evidência em investigações criminais, porém, os fios que não trazem raiz de crescimento ou tecido aderente

sobre a raiz de repouso não são candidatos adequados para análises de DNA nuclear, já que o material celular nuclear é aparentemente degradado durante o processo de queratinização do eixo do cabelo humano. Apesar do eixo não ser eficiente no fornecimento de DNA nuclear, este pode ser útil na obtenção de mtDNA, visto que as mitocôndrias são componentes comumente observados no eixo do cabelo, servindo como uma fonte rica de mtDNA[6].

Além disso, as amostras que apresentam elevado número de cópias de mtDNA, e possuem DNA nuclear degradado ou que sofreu ação ambiental, são candidatas adequadas para a análise de mtDNA[6].

Muitos laboratórios realizavam ensaio de quantificação do DNA nuclear e, em seguida, estimavam a quantidade de mtDNA presente na amostra, assumindo uma relação fixa entre DNA nuclear e mitocondrial, porém abordagens envolvendo PCR em tempo real permitem a caracterização direta do número de moléculas de mtDNA em uma célula[3].

No início de 1990, a análise de sequência de DNA a partir de porções da região de controle entrou em ampla aceitação. Dezembro de 2000 marcou o início da genômica populacional de mtDNA, com a publicação de 53 genomas mitocondriais completos a partir de um conjunto diversificado de indivíduos que representam as populações de todo o mundo. A partir do início de 2004, cerca de mil genomas mitocondriais completos foram disponibilizados em bases de dados públicas de DNA[3].

Sendo assim, fica claro que as análises de mtDNA tem sido bastante estudadas e que apresentam relevância forense, porém por existirem diversos artigos que abordam diferentes maneiras de realizar essa análise, utilizando diferentes técnicas. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo revisar a literatura recente sobre o assunto, de maneira a evidenciar a importância destas análises no contexto forense, esclarecendo as técnicas utilizadas para tal.

2. Métodos

Foi realizado levantamento bibliográfico dos últimos cinco anos (2010-2015) nos seguintes sites para buscas científicas: Bireme (Biblioteca Virtual em Saúde, um serviço especializado da Organização Pan-Americana de Saúde), especificamente nas bases de dados Medline, Lilacs, SciELO disponíveis em <www.bireme.br>, PubMed (um serviço da National Library of Medicine, Estados Unidos da América),

disponível no endereço eletrônico <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, e no Google Acadêmico disponível em <https://scholar.google.com.br> utilizando as palavras-chave em português: mtDNA, DNA mitocondrial, ciências forenses, identificação humana; levando-se em conta sua relação com o tema abordado; e como palavras-chave em inglês: mtDNA e mitochondrial DNA, forensic science, human identification. A revisão da literatura foi realizada de maneira sistemática, de modo que os critérios de inclusão foram os seguintes: 1) ter sido publicado no período de 2010 a 2015; 2) o assunto abordado em cada artigo ser pertinente aos objetos de estudo; 3) ter objetivo claro e ser fiel ao estudo realizado; 4) o estudo apresentar conclusões de acordo com o encontrado. Os artigos inclusos no presente trabalho de revisão de literatura foram selecionados após a adoção dos critérios de inclusão citados acima.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Vantagens no uso do mtDNA em relação ao DNA nuclear

Uma das principais características das amostras forenses é a presença de uma mistura de moléculas de DNA, além disso, as amostras podem estar contaminadas quando coletadas como evidências, ou ainda podem ser contaminadas no processo de coleta e análise da amostra em questão. Por isso métodos que possibilitam o enriquecimento de amostras de DNA, permitem que as sequências alvos que estão presentes em misturas complexas de sequências de DNA irrelevante possam ser utilizadas, por exemplo, como fonte de material para identificação humana e para realização de perfis genéticos.

Pequenas quantidades de DNA associadas com altos níveis de dano e fragmentação fazem a tipagem de STR se tornarem desafiadoras. Enriquecimento de mtDNA juntamente com sequenciamento de nova geração pode ajudar na recuperação de sequências do genoma mitocondrial em amostras altamente degradadas, quando o DNA nuclear está abaixo dos níveis de detecção, o que é possível devido à vantagem do número de cópias e taxa reduzida de fragmentação do DNA mitocondrial em comparação com o DNA nuclear[7].

O PCR quantitativo pode ser usado para determinar a quantidade de DNA disponível a partir de materiais extraídos indicando a possibilidade de se obter um perfil STR de DNA nuclear a partir de uma amostra degradada. Isto é de suma importância nos casos em que a quantidade de DNA nuclear total é <100 pg; o que

reduz a probabilidade de se obter um perfil STR completo de DNA nuclear, mesmo quando há aplicação de técnicas com número de cópias reduzidas[7].

A análise do mtDNA realizada com marcadores SNPs apresenta a vantagem de este DNA estar disponível em grandes quantidades dentro das células e ser menos suscetível a degradação do que o DNA nuclear, devida a natureza circular do mtDNA que o torna menos exposto a exonucleases que quebram moléculas. A presença de um maior número de moléculas por célula de mtDNA em relação ao DNA dos cromossomos nucleares também aumenta a taxa de preservação do mtDNA, tal como o fato de que eles são encapsulados em uma organela de parede dupla, porém apresenta as seguintes desvantagens: heteroplasmia; baixo poder de discriminação; compartilhado com a linhagem materna[3,8].

Apesar de a região de controle ser a mais polimórfica do genoma mitocondrial, a tipagem de mtDNA focada na amplificação e sequenciamento desta região, limita o poder de resolução a esta sequência curta, o que leva a perda de 70% da variação presente no restante do mtDNA. Sendo assim, a utilização do sequenciamento de nova geração, permite a recuperação de todo o genoma mitocondrial a partir de amostras humanas altamente degradadas [7].

O teste de mtDNA é muitas vezes a única opção viável de testes baseados em DNA para amostras como fios de cabelos sem bulbo, unhas, e elementos do esqueleto severamente degradados, devido à abundância relativa de mtDNA intacta, em comparação com DNA nuclear que não está presente nesses tipos de amostras[9].

Um dos objetivos da investigação forense pode ser estimar a idade que o indivíduo em questão apresentava ao morrer, a fim ajudar em sua identificação. No entanto, muitas vezes é difícil determinar a idade adulta, e embora existam vários métodos antropológicos para determinar a idade ao morrer, as metodologias desenvolvidas são baseadas no processo natural de envelhecimento, e uma dessas alterações são as mutações que o mtDNA apresenta[5].

O mtDNA é exposto a mais danos do que o DNA nuclear, no entanto, existem mecanismos de reparo que têm como objetivo manter a integridade do material genético. O principal mecanismo de reparo é a reparação por excisão de bases, este mecanismo é codificado pelo DNA nuclear e, embora seja mais utilizado no DNA nuclear, também está presente no reparo do mtDNA[5].

O grande potencial de análise do mtDNA também tem sido aplicado em situações em que apenas o DNA nuclear não fornece informação suficiente. Zapico e Ubelaker[5] revisaram a utilização do mtDNA na determinação da idade ao morrer com base em alterações no mtDNA, principalmente as mutações. E Wang *et al.*[10] demostraram que é possível utilizar o sequenciamento de segunda geração do genoma mitocondrial inteiro para diferenciar gêmeos monozigóticos.

3.2. Perspectivas forenses no uso do mtDNA

Um método em que produtos de PCR são utilizados para capturar sequencias alvo a partir de bibliotecas de sequenciamento de dados agregados de vários indivíduos, também conhecido como enriquecimento, foi utilizado por Maricic *et al*.[11]. Esse método é aplicado pelos pesquisadores para *pools* de DNA de bibliotecas de vários indivíduos humanos a partir do qual é possível captar o genoma mitocondrial completo.

A cobertura de todo o genoma mitocondrial das amostras se apresentou relativamente uniforme, com uma diferença de 6 vezes entre as posições de maior e menor cobertura[11].

Para a validação do método, os pesquisadores compararam as sequências determinadas no trabalho com as sequências da região HV1 sequenciadas dos mesmos indivíduos que forneceram as amostras. Elas concordaram, exceto em sete posições em indivíduos isolados; essas diferenças surgem devido a eventos de recombinação raros durante a amplificação do conjunto de bibliotecas[11].

O método descrito permite a captura eficiente de qualquer sequência única que pode ser gerada a partir de um produto de PCR. O procedimento é eficiente na medida em que o método requer apenas equipamentos e reagentes de laboratório e a captura pode ser realizada imediatamente após a obtenção dos produtos de PCR. Além disso, os pesquisadores mostraram que a abordagem pode ser multiplexada, permitindo a análise eficiente de muitas amostras em paralelo. Os pesquisadores têm usado esta metodologia para capturar os genomas mitocondriais completos a partir de amostras complexas, tais como saliva e ossos antigos. Embora a eficiência de captura seja ligeiramente inferior quando o DNA humano é contaminado por um ou dois DNAs microbianos, é possível recuperar genomas mitocondriais completos a partir da maioria das amostras, utilizando este método [11].

Com a utilização de um método de captura por sonda, Templeton *et al*. (2011) mostrou ser possível recuperar fragmentos de mtDNA humanos com menos de 100 pb de comprimento, a partir de amostras altamente danificadas, com DNA fragmentado ou com baixo número de cópias[7].

Quando possível, além dos testes feitos com o mtDNA, testes de DNA nuclear com analises de STR também foram realizados, tanto o DNA nuclear quanto o mitocondrial foram quantificados em todos os extratos, utilizando-se PCR quantitativa, em seguida foram realizadas extração, quantificação do DNA e a determinação dos perfis de STR. Em relação ao mtDNA, sua captura e enriquecimento (três rodadas de enriquecimento para todas as amostras) foram realizados de maneira semelhante a utilizado por Maricic *et al*. (2010)[11], utilizando uma biblioteca e esferas magnéticas, e em seguida as amostras foram sequenciadas[7].

Este trabalho demostrou a importância da utilização de várias rodadas de enriquecimento visando uma melhor recuperação do genoma mitocondrial total em amostras com baixo número de cópias, moléculas fragmentadas ou altamente degradadas. Este processo de enriquecimento pode mais do que dobrar e melhorar substancialmente a cobertura global do genoma mitocondrial, o que é difícil de realizar com métodos tradicionais de PCR e sequenciamento[7].

Outra metodologia capaz de sequenciar genomas mitocondriais inteiros, utilizando abordagem de sequenciamento massivo simultâneo (MPS) de todo o genoma mitocondrial humano utilizando 161 *amplicons* pequenos (média de 200 pb) sobrepostos, associados à máquina Ion Torrent Personal Genome, utilizando amostras de DNA pertencentes a pessoas de todo o mundo que possuem diferentes haplogrupos, se mostrou adequada para ser utilizada em amostras de DNA degradado[12].

Bibliotecas geradas com as amostras de DNA foram ligadas a esferas magnéticas e amplificadas, sendo a concentração de cada uma das bibliotecas posteriormente determinada por PCR quantitativo. As amostras então foram analisadas em um sequenciador de segunda geração. Cobertura de 100% do genoma mitocondrial foi alcançada em 17 amostras. Heteroplasmias pontuais foram observadas em 22 posições em 14 amostras com base no método proposto, fora as 22 heteroplasmias identificadas, apenas sete delas foram observadas no sequenciamento de Sanger e não na metodologia do trabalho[12].

A robustez do sequenciamento paralelo em massa de amostras com DNA degradado posposto foi testada através do sequenciamento de amostras naturalmente degradadas e experimentalmente degradadas; para isso amostras de um haplogrupo específico foi submetida a tratamentos com DNase em intervalos de tempo de: 5, 10, 15, 20, 30, e 45 min. Os efeitos da degradação foram observados inicialmente pela tipagem com 15 STRs autossômicos mais a amelogenina para determinação sexual. A partir desta análise ficou claro que a degradação do DNA está correlacionada com o tamanho do fragmento de PCR. As análises do DNA degradado experimentalmente tentam aproximar ao que acontece na degradação real do DNA, e de fato observamos perda de poder de distinção quando se utiliza STR autossômicos, dada essa informação, fica clara a importância do uso da metodologia proposta pelo trabalho, visto que para as amostras degradadas durante 5, 10, e 15 min, obteve-se 100% de cobertura do genoma mitocondrial e ainda foi possível determinar o haplogrupo correto em todas as amostras de DNA degradadas desde 5 a 45 minutos de tratamento com DNase[12].

Estudos forenses e arqueológicos tradicionais têm utilizado o sequenciamento das regiões de controle HV1 e 2, no entanto, essa sequência relativamente curta tem limitado o poder de resolução e pode limitar também o poder discriminatório entre linhagens maternas distintas. Fora da região de controle, a codificação de SNPs fornece resolução adicional e poder discriminatório. Em contrapartida, a abordagem de sequenciamento total do genoma mitocondrial é uma solução universal para a obtenção de dados de mtDNA de alta resolução, que podem discriminar entre linhagens maternas relacionadas. No entanto, embora a metodologia forneça um mecanismo para gerar sequências do genoma inteiro de mtDNA de amostras difíceis e degradadas, há uma clara necessidade para o desenvolvimento paralelo de bases de dados de alta qualidade do genoma mitocondrial[7].

Podemos perceber uma tendência nos últimos cinco anos no intuito de realizar a tipagem total do genoma mitocondrial[7,9,12,13]. Esta tendência é importante pois a tipagem do genoma mitocondrial total nos traz, além das informações já amplamente pesquisadas das regiões não codificantes, informações sobre as regiões codificantes que podem ser de interesse forense. Apesar de a região de controle (não codificante) ser a mais polimórfica do genoma mitocondrial, a tipagem de mtDNA focada na amplificação e sequenciamento da região de controle limita o

poder de resolução a esta sequência curta, o que leva a perda de 70% da variação presente no restante do mtDNA[7].

Também pudemos perceber que alguns autores utilizam a técnica de MPS[10,12], técnica esta que possui algumas vantagens se comparada com o sequenciamento tradicional de Sanger, que é muito utilizado para análises de amostras antigas e com pouca quantidade de DNA, e é tipicamente empregado para o sequenciamento apenas da região do controle ou partes dela, pois esta técnica de Sanger gera enormes custos e esforços para obter perfis com esta metodologia às normas forenses. Estudos recentes têm demonstrado tanto que a metodologia MPS pode efetivamente recuperar perfis de genomas mitocondriais completos, mesmo a partir de amostras forenses altamente danificadas e degradadas, e que o sequenciamento do genoma mitocondrial completo por MPS pode ser eficaz em termos de custos em comparação com os métodos atualmente utilizados pela comunidade forense para a geração de dados de mtDNA[13].

Para uma boa análise forense precisamos levar em consideração qual a origem da amostra biológica, o tipo de amostra que estamos analisando, a quantidade de amostra que temos disponível, a integridade do DNA da amostra em questão, e adicionalmente a isso, precisamos saber quais informações precisamos obter, ou quais perguntas queremos responder para podermos decidir qual a melhor forma de analisar e quais metodologias mais adequadas para obtermos tais informações e repostas. Atualmente temos disponíveis diversos tipos de análises que podem ser feitas, com diferentes componentes do DNA das células, e claramente cada metodologia é mais adequada a um determinado objetivo.

Muitas vezes é impraticável sequenciar grandes porções do genoma mitocondrial devido ao custo e aos esforços necessários para obter tal sequência, até mesmo a obtenção de perfis da região do controle são custosas e caras (especialmente em comparação com a tipagem por STR), em parte, porque os dados desta sequência de mtDNA normalmente são utilizados quando o material genético está bastante limitado e/ou degradado, porém diversos métodos têm surgido e diminuído tais custos e dificuldades de processamento[14].

Apesar do interesse da comunidade forense na recuperação de todo o genoma de mtDNA, mesmo com amostras degradadas e com pouca quantidade de DNA, testes com mtDNA ainda não são rotineiramente empregados pela maioria dos laboratórios forenses de rotina. A comunidade forense tem, em vez disso, e de

forma compreensível, favorecendo o uso de múltiplos STRs, pois eles oferecem maior poder discriminatório do que o genoma mitocondrial. O desenvolvimento de mini-STR multiplex *kits* de maior eficiência estenderam a aplicação de testes STR para amostras mais degradadas[15].

3.3. Análises de heteroplasmias no mtDNA

O fato de misturas de mtDNA serem comuns devido a heteroplasmia e a contaminações, leva a necessidade de pesquisas que aprimorem ou desenvolvam técnicas capazes de melhorar a discriminação dos diferentes tipos de mtDNA da mistura. Além do trabalho de Maricic *et al*.[11] , o de Holland *et al*.[16] também propõe uma melhor identificação de diferentes mtDNAs e a detecção de heteroplasmia através do sequenciamento de segunda geração (SGS).

Se o método proposto nessa pesquisa for validado para tal análise o potencial discriminatório do sistema de tipagem através do mtDNA pode ser mais rentável do que os métodos tradicionais atualmente em prática. Além disso, se o método se revela robusto, pode ser possível distinguir entre os diferentes parentes maternos[16].

Os experimentos realizados pelos pesquisadores iniciaram-se com a coleta de 33 amostras de sangue ou células bucais, de pessoas aparentadas ou não, sendo que foram identificadas 27 linhagens maternas diferentes. Em seguida o DNA nuclear dessas amostras foi extraído e quantificado e a sequência de mtDNA foi determinada[16].

Um total de 4% das linhagens (1 de 25) mostrou haver heteroplasmia quando se utilizou o método de Sanger, em comparação, 44% (11 em 25) mostrou haver heteroplasmia quando se utilizou a abordagem do sequenciamento de segunda geração. Para todas as observações de heteroplasmia nas 24 linhagens, o componente de menor quantidade não atingiria um nível que normalmente seria observável com o método de Sanger[16].

Os estudos conduzidos com a família produziram resultados limitados, todos os 5 membros apresentaram polimorfismos em 16192 T, 16256 T e 16270 T. Além disso, cada um deles tinha níveis detectáveis de SGS-heteroplasmia na posição 16192 C. A gama de heteroplasmia não foi capaz de diferenciar os indivíduos dentro da mesma linhagem. Mais estudos são necessários para explorar um maior número de linhagens. Quando amostras são confrontadas com duas fontes de referência em

um caso forense, e as duas apresentam a mesma sequência da região de controle, as perspectivas de utilizar a heteroplasmia de baixo nível para diferenciar os dois são elevadas[16].

O sequenciamento de segunda geração como foi empregado neste estudo é reprodutível na detecção de baixos níveis de heteroplasmia. Além disso, dada a robustez dos dados e a percentagem relativamente baixa de heteroplasmia detectada, os pesquisadores dizem ser possível supor que o método ainda será reprodutível em percentuais mais elevados de heteroplasmia. Os dados e observações descritos permitem o desenvolvimento de padrões iniciais para relatar variantes heteroplasmicas de baixo nível em pesquisas e futuras em análises forenses[16].

Morovvati *et al.*[17] também avaliou a presença de heteroplasmias, porém apenas na região hipervariável do mtDNA, em amostras de sangue de 30 iranianos que pertencem a dez famílias não relacionadas de três gerações sequenciais (avó, mãe e filha), com o objetivo de avaliar raras substituições heteroplasmicas triplas.

A sequência das regiões hipervariáveis foi determinada e comparada com a sequência referência[18] o que mostrou não haver heteroplasmia na região HV1, porém indicou haver heteroplasmia em duas das dez famílias analisadas. Em uma das famílias a avó apresentou heteroplasmia (T/C) nas posições de nucleótido 146 e 151, mas na mãe e na filha tal heteropasmia não foi detectada. Em outra família em que a heteroplasmia foi detectada, um caso de heteroplasmia tripla foi observada na filha, nas posições dos nucleótideos 146, 151 e 295, estas heteroplasmias, no entanto, não eram claras na avó nem na mãe[17].

A heteroplasmia em mtDNA, como já dito anteriormente, não é um fenômeno raro e provavelmente existe em todas as pessoas, mas uma heteroplasmia tripla em um membro da família em que as outras pessoas analisadas não as apresentam é uma nova descoberta. Os resultados demonstram que uma ou duas diferenças sequenciais entre as amostras de mtDNA não justificam a exclusão de relação entre estas. No estudo em questão, a diferença média de nucleotídeos entre pessoas independentes na região HV2 foi de 2,8 nucleotídeos[17].

Desse modo, os pesquisadores concluíram que as proporções de heteroplasmia podem mudar em uma única geração, que os descendentes de uma mulher podem ter diferentes genótipos, e que a heteroplasmia pode reverter-se para

homoplasmia em apenas duas ou três gerações. A teoria do gargalo genético sugere que o mtDNA de algumas mitocôndrias é amplificado seletivamente durante a oogênese e/ou durante o desenvolvimento e, portanto, um genótipo mutante pode tornar-se predominante e fixado em futuras gerações.

3.4. A importância das bases de dados nas análises de mtDNA

Testes de DNA mitocondrial no contexto forense requerem bancos de dados populacionais de alta qualidade e precisão, capazes de estimar a raridade de haplótipos questionados. Atualmente, no entanto, as bases de dados referentes ao mtDNA disponíveis incluem apenas as informações da região controle do mtDNA.

A criação de base de dados provenientes principalmente da região controle do mtDNA se deu principalmente por que as tipagens forenses envolvendo o genoma mitocondrial tem historicamente focado nos dois segmentos hipervariáveis da região não codificadora de controle, pois esta região possui a maior taxa de variabilidade de todo o genoma mitocondrial, e, portanto, apresenta maior oportunidade para a diferenciação inter-individual. Porém, o exame restrito a essas regiões limita o poder dos testes forense utilizando mtDNA, levando a situações em que os dados HV1 e HV2 não fornecem informações discriminatórias suficiente para distinguir linhagens maternas distintas[14].

A falta de bases de dados de alta qualidade abrangendo toda a região codificadora do genoma mitocondrial dificulta uma compreensão completa do valor discriminatório que os dados desta região poderiam fornecer a partir de indivíduos aleatoriamente amostrados. O GenBank é um banco que possui genomas mitocondriais completos e é atualizado regularmente com novas informações, mais de 15 000 haplótipos inteiros do genoma mitocondrial estão disponíveis. Embora contenha um número crescente de sequências completas, os dados disponíveis ainda não são satisfatórios para um banco de dados de referência forense, pois estes dados não foram desenvolvidos para fins forenses ou com as normas forenses, além de os eletroferogramas não estarem disponíveis para serem acessados[9,14,19].

Além disso, maioria das sequências disponíveis no GenBank não foram produzidos com uma amostra aleatória: indivíduos não aparentados que representam grupos específicos da população. O GenBank tem regulamentação limitada e há sequências errôneas em seu banco de dados, o que significa que um

pesquisador utilizando dados provenientes do GenBank deve ter a competência e a experiência necessárias para que este mesmo possa fazer o controle de qualidade dos dados[9,14,19].

O mesmo se aplica para o Mitomap, uma base de dados que tem sido uma compilação importante de dados do mtDNA nos últimos 28 anos, porém também não foi criada e com intuitos para aplicação forense. O Mitomap é um banco de dados que abrange a variação humana do mtDNA e sua relação com a evolução humana e com doenças. Informações essenciais sobre a sequência de referência mitocondrial são fornecidas, adicionalmente a uma extensa compilação de variantes do mtDNA[20, 21].

Estão em curso esforços para melhorar e expandir conjuntos de dados forenses sobre as regiões de controle de mtDNA acessíveis ao público; mais de 5000 novas sequências representando mais de 30 populações em breve estará disponível na mais recente atualização da base de dados EMPOP[14].

O EMPOP utiliza o método *String Alignment*, um algoritmo de busca baseado em texto que converte sequências de consulta de banco de dados em cadeias de nucleotídeos livre de alinhamento e, assim, garante que um haplótipo seja encontrado em uma consulta de banco de dados, independentemente de seu alinhamento[22].

As bases de dados SWGDAM e EMPOP incluem informações de haplótipos da região controle do mtDNA, no entanto, novos métodos que mais fácil e rapidamente recuperaram mtDNA da região codificante têm gerado cada vez mais dados dessa região, os quais estão se tornando cada vez mais disponíveis. Embora o aumento de informação que ajuda a acessar todo o genoma mitocondrial esteja acontecendo, e desta maneira ajudando a maximizar sua utilização no campo forense, ainda é necessário um grande aprimoramento. Desta maneira os pesquisadores da área têm feito esforços para aumentar em larga escala a disponibilidade de dados de alta qualidade do genoma mitocondrial populacional, que possam ser utilizados como referência; e também para melhorar a infraestrutura de tecnologia da informação necessária para acessar os dados tornando-se possível seu emprego em casos forenses[9].

Sendo assim, foram desenvolvidos de mais de 400 genomas mitocondriais completos e de qualidade para aplicação forense, a partir de amostras séricas com baixa quantidade de moléculas de DNA. Para a geração desses genomas com

qualidade forense os pesquisadores utilizaram um fluxo de trabalho de sequenciamento em que quase todas as etapas de pipetagem foram realizadas roboticamente. As altas taxas de sucesso (99,4% das vezes quando as amostras de DNA apresentavam quantidades superiores a 10 pg) na amplificação e no sequenciamento relatadas por Just *et al*. (2014)[9] demonstram que é viável gerar haplótipos de genoma mitocondrial completos de qualidade forense em um ambiente que trabalha com casos de rotina forense. Neste trabalho os pesquisadores também demonstraram que grandes fragmentos de mtDNA (> 2 kb) podem ser recuperados a partir de amostras com moléculas de DNA preservadas porém com baixa quantidade destas[9].

A classificação de haplogrupos a partir da análise de SNPs presentes em regiões não codificantes do mtDNA tem tido sua importância reconhecida, deste modo muitos métodos para a análise destes SNPs têm sido desenvolvidos com o intuito de reconhecer estes haplogrupos. Nunotani *et al.*[23] objetivou desenvolver sistemas completos de análise de haplogrupos de mtDNA utilizando *primers* projetados para a classificação de amostras de DNA altamente degradadas. Para avaliar a eficácia destes sistemas no agrupamento de DNA degradado, foi utilizada uma amostra de osso antigo de um esqueleto Jomon, descoberto no local do Shimekake em Nagano no Japão.

As amostras utilizadas no estudo foram coletadas de 214 japoneses adultos, saudáveis e não aparentados. O DNA foi extraído ua partir de sangue ou células da mucosa bucal. A ossada analisada é estimada como pertencendo ao período Jōmon, de 3300 a 2200 anos atrás, e foi utilizada como amostra de DNA altamente degradada. Os 46 SNPs da região codificadora do mtDNA foram escolhidos com base em um banco de dados de mtSNP (http:.//www.phylotree.org/) e também baseados em relatos anteriores, a fim de classificar os indivíduos em classes e subclasses de haplogrupos[23]. Os sistemas utilizados demonstraram ser poderosos instrumentos de rastreio para os principais haplogroups de mtDNA prevalentes na população japonesa; além disso, estes sistemas são capazes de analisar amostras de DNA altamente degradadas em estudos forenses [23].

Outro trabalho que objetivou a recuperação e o desenvolvimento de haplótipos de qualidade forense desenvolveu 588 haplótipos de genomas mitocondriais completos, abrangendo três grupos da população dos EUA (afro americanos, caucasianos e hispânicos), as amostras de sangue foram coletadas

aleatoriamente e de todas as amostras 175 eram de Africano-Americano, 275 de Caucasianos, e 175 hispânicos. As amostras foram submetidas à extração do genoma mitocondrial através da utilização de pipetagem robótica; em seguida algumas, mas não todas as amostras de mtDNA foram quantificadas antes da PCR, usando o PCR quantitativo. A amplificação do genoma mitocondrial completo foi realizada com oito *amplicons* sobrepostos e mais uma vez foram utilizados processamentos robóticos[13].

Das 625 amostras que foram coletadas e submetidas à PCR, 37 foram excluídas devido à falha de PCR em duas ou mais das oito regiões alvo do genoma mitocondrial. Entre as 242 amostras quantificadas, 12 amostras foram excluídas devido a múltiplas falhas de PCR, e todas estas amostras apresentavam quantidades inferiores a 10 pg/ml de mtDNA. Falhas no PCR podem ocorrer devido a mutações no local de anelamento dos *primers*. Um total de 52 polimorfismos foram encontrados em todas as regiões de anelamento dos 16 *primers* em 46 das 588 amostras processadas (7,8%)[13]. O estudo aderiu às regras de alinhamento filogenético com referência à atual filogenia de mtDNA, além disso, repetidas revisões dos dados brutos foram realizadas e a inclusão de várias medidas de controle de qualidade asseguram que os haplótipos atendem aos mais altos padrões de qualidade de dados e são apropriados para o uso forense[13].

Quando comparados os dados obtidos neste estudo (588 haplótipos) com haplótipos presentes nas bases de dados AFDIL (*Armed Forces DNA Identification Laboratory*) e EMPOP foram identificadas 27 discrepâncias em 23 amostras, sendo que a taxa de não concordância foi de 4,6%. A maioria destas discrepâncias (70%) foi devido à heteroplasmias não identificadas ou incorretamente identificadas tanto no AFDIL quanto no EMPOP[13].

No total, 588 haplótipos dos genomas mitocondriais completos foram gerados: Afro Americano 170; Caucasiano 263 e Hispânicos 155. Para a amostra da população Afro Americana, o aumento do número de haplótipos únicos que seriam detectados pelo sequenciamento de HV1 e HV2 em comparação com o sequenciamento da região HV1 sozinha é de 13,2%; e aumentando o sequenciamento de HV1 e HV2 para tipagem completa da região CR aumentaria o número de haplótipos únicos detectados em 8,3%. Em comparação com o sequenciamento da região CR, o sequenciamento do genoma mitocondrial completo

aumentaria o número de haplótipos únicos em 29,2% para esta amostra da população[13].

Trezentos e noventa e três haplogrupos distintos foram atribuídos aos 588 haplótipos reportados neste estudo. Em média, o sequenciamento do genoma mitocondrial completo aumentou a proporção de haplótipos únicos em cada amostra populacional 19,3% em comparação com o sequenciamento da região CR, e 35,2% em relação às regiões HV1/HV2, dados que revelam claramente o poder discriminatório de tipagem do genoma mitocondrial completa entre amostragem aleatória de indivíduos. Os dados obtidos neste trabalho estarão disponíveis para consulta em uma próxima versão do EMPOP, e no GenBank [13].

Diversos autores [9,13,14] falam sobre a importância de bases de dados de mtDNA com dados de boa qualidade para utilização forense. Apesar de a comunidade científica estar trabalhando para a melhora dos dados, atualmente o aumento da quantidade de informações geradas pelo sequenciamento total de genomas mitocondriais e o avanço das tecnologias capazes de realizar esse sequenciamento não estão em concordância com a quantidade de dados disponível, assim, são necessários esforços futuros para o desenvolvimento de bases de dados de mtDNA de toda população em bancos de dados de referência adequados para comparações forenses.

3.5. Uso do mtDNA – Diretrizes e aspectos legais

A DNA *Commission of the International Society of Forensic Genetics* (ISFG) publica regularmente orientações e recomendações relativas à aplicação de polimorfismos de DNA para a questão da identificação humana. Uma publicação da ISFG em 2000 dirigiu-se à análise e interpretação de mtDNA no uso de casos forenses. Com base nas diretrizes da ISFG, os desafios que cercam os estudos de casos envolvendo o mtDNA e os desafios do desenvolvimento de uma base de dados populacional, os quais surgiram desde o estabelecimento destas diretrizes e a partir do desenvolvimento das técnicas e do uso do mtDNA para fins forenses [24].

A contaminação é uma das maiores preocupações quando se trata de testes de mtDNA, já que este é extremamente sensível, mais do que os outros métodos baseados em PCR forenses. Tendo isto em mente, a ISFG criou algumas recomendações gerais para evitar este problema, tais medidas se aplicam tanto no uso forense do mtDNA quanto no seu uso para criação de bases de dados

populacionais. São elas: Condições laboratoriais apropriadas, isso inclui espaços, instrumentos, vestimentas e reagentes dedicados somente ao uso para testes de mtDNA; o uso de controles (controle negativo, branco de reagente e controles positivos), os quais devem ser utilizados durante todos os processos laboratoriais; tolerância à baixos níveis de contaminação já que esta pode levar a resultados falsos positivos; sequências redundantes devem ser obtidas para cada posição do mtDNA para incluir ambos os iniciadores de sequenciamento quando possível; sequencias de consenso devem ser determinadas utilizando um software dedicado para o alinhamento de dados brutos com base na sequência de referência de Cambridge; sequências dadas como de consenso devem ser confirmadas por uma segunda análise dos dados brutos independente da anterior e, por fim, recomenda-se a participação regular em programas de proficiência para laboratórios forenses que utilizam teste de mtDNA[24].

Ao longo da última década, muitos tipos de erros têm sido detectados em uma série de estudos genéticos populacionais envolvendo o mtDNA. Esses erros foram atribuídos à contaminação e ao manuseamento das amostras, bem como erros de escrita e de transcrição, porém mais comumente, os erros têm sido atribuídos a erros de interpretação de sequência decorrentes da fraca qualidade de dados brutos. Medidas para minimizar estes tipos de erros foram publicadas pela ISFG e citadas acima[24].

Quando se trata de testes em amostras degradadas o maior obstáculo é realizar o sequenciamento do DNA. Desta forma, os passos laboratoriais que precedem o sequenciamento são críticos para a recuperação do DNA da amostra, sem que haja contaminação. A fim de evitar a contaminação nas várias etapas críticas, algumas diretrizes devem ser seguidas quando há processamento de amostras: salas onde as amostras são extraídas e salas onde as reações de amplificação são preparadas devem ser fisicamente separadas das salas onde o DNA é amplificado e manipulado. Cada laboratório deve dispor de equipamentos próprios, de modo a que transferências entre laboratórios de pré-PCR e pós-PCR sejam evitadas ao máximo. Além disso, controles experimentais devem ser inclusos em todas as etapas de processamento laboratorial. Réplicas dos testes devem ser realizadas em todas as amostras, para assegurar resultados consistentes e reprodutíveis; e, finalmente, os dados devem ser avaliados criticamente, para garantir que eles apresentem uma logica[15].

Como a contaminação é sempre uma preocupação ao lidar com amostras forenses, podemos imaginar que o sequenciamento total do genoma mitocondrial com diversas etapas para esse processo possa ser uma grande fonte de contaminação, porém a utilização de enriquecimento do mtDNA como mostrado em [7,11] com objetivo de recuperar o genoma mitocondrial completo reduz estas preocupações com o teste de DNA mitocondrial, além disso, também reduz a preocupação com a mistura de amostras, já que muito menos etapas e trocas de tubos são utilizadas na metodologia abordada [7].

Muitos problemas éticos e legais surgem na preparação de uma base de dados de DNA e estes problemas são especialmente encontrados durante a análise dos regulamentos legais sobre o assunto. Existem basicamente três grupos principais de possibilidades quando se lida com bases de dados: Um sistema baseado em uma análise de DNA *fingerprinting* geral da população e a conservação da análise de perfil de DNA de todas as evidências encontradas na cena do crime; um sistema baseado na análise de DNA de amostras de uma lista específica de crimes e apenas o registro dos perfis de DNA de todas as evidências encontradas na cena do crime para estes crimes específicos; e um sistema baseado na análise específica de um caso, as amostras só são colhidas de indivíduos que são considerados com uma grande ligação com o crime sob investigação, e uma comparação dos elementos de prova que foi coletado na investigação deste determinado crime[25].

O primeiro sistema possui vantagens como uma maior eficiência policial já que tendo o perfil de todos os cidadãos é mais fácil de haver uma coincidência dos perfis, além disso, esse sistema permite a igualdade de todos os cidadãos, já que todos eles teriam seu perfil genético registrado, porém esse sistema gera desvantagens como a sujeição forçada de todos os indivíduos a cederem amostras biológicas, incluindo aqueles que não têm ligação nenhuma com o crime, o que gera um enorme gasto econômico, no processamento das amostras[25].

O segundo sistema apresenta vantagens como a análise da proporcionalidade entre a liberdade pessoal e segurança dos cidadãos, e possui desvantagens, pois para a aplicação desse sistema seria necessária uma legislação muito detalhada, o que leva a outra desvantagem que é a dificuldade de intercâmbio internacional de informações[25].

Já o terceiro sistema apresenta vantagens como aumento da possibilidade de reintegração uma vez que a sentença foi dada. E desvantagens como a eficiência mínima ao investigar um crime com um autor desconhecido[25].

Acreditamos que o sistema que melhor se aplicaria no caso brasileiro é o segundo, já que um sistema semelhante, a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos, tem sido aplicado para o emprego em amostras de DNA nuclear. A devida inserção de perfis, no banco de perfis genéticos, das amostras biológicas (vestígios) deixadas por infratores nos locais de crime ou no corpo das vítimas poderem ser confrontados entre si, o que pode ajudar na detecção de crimes seriais, podem ser confrontados com perfis genéticos dos indivíduos cadastrados como condenados e identificados criminalmente - nos termos da Lei nº 12.654, de 28 de maio de 2012. Sendo assim, é possivel que esta rede seja expandida, incorpotando perfis genéticos de mtDNA[26].

4. Conclusão

O mtDNA pode ser uma ótima alternativa na tipagem de DNA quando o DNA nuclear está disponível em pequenas quantidades, degradado ou contaminado e a possibilidade de realizar testes com o DNA nuclear é pequena. Devido ao maior número de cópias de mtDNA por célula, e ao fato deste DNA ser circular, e presente dentro de uma organela com membrana celular dupla, o mtDNA possui certa proteção quanto ao grau de degradação. Além disso, o mtDNA é capaz de ligar pessoas à sua linhagem materna, já que este possui herança exclusivamente materna.

Com a revisão realizada nesse trabalho podemos perceber que há uma grande tendência em analisar e sequenciar o genoma mitocondrial inteiro, e não só as regiões não-codificantes como anteriormente, desse modo tem surgido diversas metodologias capazes de realizar esta análise, mas ainda não foi estabelecida uma metodologia ouro para a análise em questão. Podemos perceber também que tem se despendido esforços no sentido de encontrar e analisar as heteroplasmias presentes no mtDNA devido a sua capacidade de ajudar na identificação, por fim também foi possível perceber a tendência com a preocupação na criação de bancos de dados que possam ser utilizados de modo sistemático e de qualidade forense.

Apesar de a análise de mtDNA ainda não ser empregada nos laboratórios de rotina forense este é um assunto que tem sido amplamente estudado pela

comunidade científica e este endossamento no conhecimento do assunto é sempre benéfico, podendo ajudar na implementação de novos métodos, barateando o uso destas análises, além de auxiliar na criação de *kits* que possam ser amplamente utilizados.

Referências

1. Lembring M. Application of Mitochondrial DNA Analysis in Contemporary and Historical Samples. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 2013; 950. 62 pp.
2. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Holland M, *et al*. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Guidelines for mitochondrial DNA typing. Int. J. Legal Med. 2000; 113:193–196. https://doi.org/10.1007/s004140000149
3. Butler, JM. Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. Academic Press, 2005. p. 241-298.
4. Jobling MA, Gill P**.** Encoded Evidence: DNA In Forensic Analysis. Nature Reviews Genetics 2004; 5:739–751. https://doi.org/10.1038/nrg1455
5. Zapico SC, Ubelaker DH. mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. Aging and Deseade Dez 2013; 4(6):364-380. https://doi.org/10.14336/ad.2013.0400364
6. Linch CA, Whiting EA, Holland MM. Human Hair Histogenesis for the Mitochondrial DNA Forensic Scientist. J.Forensic Sci. 2001. 46(4):844–853. https://doi.org/10.1520/JFS15056J
7. Templeton JEL, Brotherton PM, Llamas B, Soubrier J, Haak J, Cooper A *et al.* DNA capture and next-generation sequencing can recover whole mitochondrial genomes from highly degraded samples for human identification. Investigative Genetics 2013; 4(26):1-13. https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-26
8. Jobling MA & Gill P. Encoded Evidence: DNA In Forensic Analysis. Nature Reviews Genetics 2004; 5:739–751. https://doi.org/10.1038/nrg1455
9. Just RS, Scheible MK, Fast AS, Struk-Andreaggi K, Higginbotham JL, Lyons EA, *et al*. Development of forensic-quality full mtGenome haplotypes: Success rates with low template specimens. Forensic Science International: Genetics Jan. 2014; 10:73–79. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.01.010
10. Wang Z, Zhu R, Zhang S, Bian Y, Lu D, Li C. Differentiating between monozygotic twins through next-generation mitochondrial genome sequencing. Analytical Biochemistry 2015; 490:1-6. https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.08.024

11. Maricic T, Whitten M, Pääbo S. Multiplexed DNA Sequence Capture of Mitochondrial Genomes Using PCR Products. PLoS ONE Nov.2010; 5(11):1-5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014004
12. Chaitanya L. Ralf A, Oven MV, Kupiec T, Chang J, Lagacé R, *et al*. Simultaneous Whole Mitochondrial Genome Sequencing with Short Overlapping Amplicons Suitable for Degraded DNA Using the Ion Torrent Personal Genome Machine. Human mutation Set. 2015; 36(12):1236–1247. https://doi.org/10.1002/humu.22905
13. Just RS, Scheible MK, Fast AS, Struk-Andreaggi K, Röck AW, Bush, *et al*. Full mtGenome reference data: Development and characterization of 588 forensic-quality haplotypes representing three U.S. populations. Forensic Science International: Genetics 2015; 14:141–155. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.021
14. Irwin JA, Parson W, Coble MD, Just RS. mtGenome reference population databases and the future of forensic mtDNA analysis. Forensic Science International: Genetics 2011; 5:222–225. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2010.02.008
15. Loreille OM & Irwin JA. Capillary Electrophoresis of Human mtDNA Control Region Sequences from Highly Degraded Samples Using Short mtDNA Amplicons. Methods in Molecular Biology Jan 2012; 330:283- 299. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-461-2_20
16. Holland MM, McQuillan MR, O´Hanlon KA. Second generation sequencing allows for mtDNA mixture deconvolution and high resolution detection of heteroplasmy. Croat. Med. J. May 2011; 52:299-313. https://doi.org/10.3325/cmj.2011.52.299
17. 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 2011;13(2)103-106.
18. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature Abril 1981; 290:457-465. https://doi.org/10.1038/290457a0
19. Johnson RN, Wilson-Wilde L, Linacre A. Current and future directions of DNA in wildlife forensic Science. Forensic Science International: Genetics Maio 2014; 10:1–11. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.12.007
20. Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, Wallace, DC. MITOMAP: a human mitochondrial genome database—2004 update. Nucleic Acids Research 2005; 33: D611–D613. https://doi.org/10.1093/nar/gki079
21. Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, Xie HM, Chalkia D, Sarmady M, Procaccio V, Wallace DC. mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster. Current Protocols in Bioinformatics 2013; 12:1-23. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0123s44

22. Banco de dados EMPOP. Disponível em: <http://empop.online>. Acesso em: 24 de Novembro de 2015.
23. Nunotani M, Sato N, Kamei S, Shiozaki T, Hayashi T, Asamura H. Development of Multiple Assays using 46 SNPs for Comprehensive mtDNA Haplogrouping and Application to Highly Degraded DNA. Journal of Forensic Science, Techinical note, 2015.
24. Parson W, Gusmão L, Hares DR, Irwin JÁ, Mayr WR, Morling N, *et al*. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typin. Forensic Science International: Genetics 2014; 13:134–142. https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.07.010
25. Guillén M, Lareu MV, Pestoni C, Salas A, Carracedo A. Ethical-legal problems of DNA databases in criminal investigation. Journal of Medical Ethics 2000; 26:266–271. https://doi.org/10.1136/jme.26.4.266
26. Brasil, Serviço Público Federal, Ministério da Justiça, Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos, Comitê Gestor. Relatório da Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos. Disponível em: < http://www.justica.gov.br/noticias/banco-de-perfis-geneticos-reune-mais-de-2-500-amostras-e-ja-auxiliou-71-investigacoes-no-brasil/relatorio_ribpg_nov_2014.pdf>. Acesso em 02 de Outubro de 2015.