

GENÉTICA:

Molecular, humana e médica

2

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

GENÉTICA:

Molecular, humana e médica

2

Benedito Rodrigues da Silva Neto
(Organizador)

Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Camila Alves de Cremo

Luiza Alves Batista

Maria Alice Pinheiro

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2021 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2021 Os autores

Copyright da edição © 2021 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás

Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí

Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federacl do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emidio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco

Genética: molecular, humana e médica 2

Diagramação: Daphynny Pamplona
Correção: Bruno Oliveira
Indexação: Gabriel Motomu Teshima
Revisão: Os autores
Organizador: Benedito Rodrigues da Silva Neto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G328 Genética: molecular, humana e médica 2 / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2021.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-5983-575-1

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.751211410>

1. Genética. I. Silva Neto, Benedito Rodrigues da (Organizador). II. Título.

CDD 576

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, desta forma não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

Podemos definir a genética como a parte da ciência que estuda a hereditariedade, assim como a estrutura e função dos genes e a variação dos seres vivos. Através da genética podemos compreender os mecanismos e leis que regem a transmissão das características através das gerações. Essa genética clássica quando aprofundada revela outras subáreas, como a genética molecular que tem as suas fundações na genética clássica, mas dá um enfoque maior à estrutura e função dos genes ao nível molecular, abordando o DNA, genes e o genoma que controlam todos os processos vivos, nos ajudando na compreensão da biologia humana em saúde e doença.

Outra subárea de importância é a genética humana, que tem como estratégia descrever o estudo da transmissão genética em seres humanos, englobando a genética clássica propriamente dita, a citogenética, a bioquímica, genética populacional, genética do desenvolvimento etc. Por fim a genética médica ou genética clínica é a especialidade que lida com o diagnóstico, tratamento e controle dos distúrbios genéticos e hereditários. É uma área que enfoca não só o paciente, mas também toda a família, principalmente por meio do aconselhamento genético.

Além das três subáreas que destacamos acima a genética compreende um leque outras áreas específicas, no entanto ao mencionar a genética humana, molecular e médica estamos abrindo caminho para o segundo volume do livro publicado dentro do contexto dessas definições.

É muito nítido que nos últimos anos a genética tem influenciado diversas pesquisas promissoras em todo o mundo, contribuindo de forma significativa em diversas áreas e principalmente na saúde e aliada à revolução tecnológica essa tem contribuído muito com o avanço no campo da pesquisa.

Assim, esperamos que mais uma vez o conteúdo deste material possa somar de maneira significativa aos novos conceitos aplicados à genética, influenciando e estimulando cada vez mais a pesquisa nesta área em nosso país. Desejamos que seja mais um volume que anteceda inúmeros outros dentro desse contexto. E por fim parabenizamos cada autor pela teoria bem fundamentada aliada à resultados promissores, e principalmente à Atena Editora por permitir que o conhecimento seja difundido e disponibilizado para que as novas gerações se interessem cada vez mais pelo ensino e pesquisa em genética.

Desejo a todos uma excelente leitura!

Benedito Rodrigues da Silva Neto

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS E INFERTILIDADE MASCULINA: ACONSELHAMENTO GENÉTICO E ICSI

Alan da Silva Lira
Leide de Almeida Praxedes
Leila Montenegro Silveira Farah
Johny Adrian Rodrigues Nascimento Oliveira
Ana Paula Muniz Serejo
Deise Seferino Lima

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7512114101>

CAPÍTULO 2..... 13

APLICAÇÕES DA GENÉTICA MOLECULAR NA CIÊNCIA FORENSE - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cássia Pereira da Silva
Milena Martins do Nascimento
Adriana Freitas Neves

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7512114102>

CAPÍTULO 3..... 28

ASPECTOS GENÉTICOS DA FIBROSE CÍSTICA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Amanda Holanda Cardoso Maciel
Vitor Araújo Marinho
Lídia Vieira do Espírito Santo
Guilherme Pinho Mororó
Marla Rochana Braga Monteiro
Morgana Cléria Braga Monteiro
Lucas Lessa de Sousa
Raquel Matoso Freire
Lucas Oliveira Sibellino
Ticiane Freire Bezerra
Maria Denise Fernandes Carvalho

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7512114103>

CAPÍTULO 4..... 41

DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA DO POLIMORFISMO BDNF VAL66MET EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME DA BAHIA, BRASIL

Wellington dos Santos Silva
Tiago da Silva Lopes
Danielle Palma Silva Barreto
Rita Lucena
Abrahão Fontes Baptista
Gabriel Santos da Silva

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.7512114104>

CAPÍTULO 5	47
DNA REPAIR GENES POLYMORPHISMS: INFLUENCE UPON SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND ITS CLINICAL MANIFESTATIONS	
Suelen Cristina de Lima	
Jaqueline de Azevêdo Silva	
Nadja Maria Jorge Asano	
Gisele Vagjel Fernandes	
Lucila Maria Valente	
Paulo Roberto Eleutério de Souza	
Sergio Crovella	
Paula Sandrin-Garcia	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.7512114105	
CAPÍTULO 6	58
GENÉTICA FORENSE APLICADA À INVESTIGAÇÃO DE CRIMES SEXUAIS	
Angela Aparecida de Oliveira	
Darlene Cabral	
Danielly Beraldo dos Santos Silva	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.7512114106	
CAPÍTULO 7	69
O IMPACTO DA MEDICINA PERSONALIZADA NO SETOR DA SAÚDE	
Benedito R. da Silva Neto	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.7512114107	
SOBRE O ORGANIZADOR	74
ÍNDICE REMISSIVO	75

CAPÍTULO 1

ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS E INFERTILIDADE MASCULINA: ACONSELHAMENTO GENÉTICO E ICSI

Data de aceite: 01/10/2021

Alan da Silva Lira

Mestrado em Ciência animal, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís- MA
<https://orcid.org/0000-0003-3162-7714>

Leide de Almeida Praxedes

Doutora em Genética, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo -SP
<http://lattes.cnpq.br/0266819401910733>

Leila Montenegro Silveira Farah

Doutora em Genética, Universidade de São Paulo- USP, São Paulo -SP
<http://lattes.cnpq.br/300406388699716>

Johny Adrian Rodrigues Nascimento Oliveira

Graduação em Biomedicina, Faculdade UNINASSAU, São Luís- MA
<https://orcid.org/0000-0003-1386-7554>

Ana Paula Muniz Serejo

Mestrado em Saúde e Ambiente (PPGSA/UFMA), São Luís- MA,
<https://orcid.org/0000-0002-4376-4364>

Deise Seferino Lima

Especialista em Genética Humana e Clínica, Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, FACIS, São Paulo -SP
<http://lattes.cnpq.br/8442711473320523>

RESUMO: Anormalidades cromossômicas surgem principalmente durante os processos meióticos e/ou mitóticos modificando a quantidade ou estrutura dos cromossomos nas células. Nos

mamíferos, o cromossomo Y é essencial para a determinação do sexo, diferenciação precoce de gênero e controle da espermatogênese. Uma variedade de anormalidades citogenéticas está associada à perturbações da espermatogênese resultantes da diminuição da fertilidade ou infertilidade masculina, tais como oligozoospermia e azoospermia. O aconselhamento genético é definido como um processo de comunicação relativo à ocorrência e ao risco de recorrência de uma doença genética em uma família. Envolve-se num estudo abrangente de genética com vários protocolos, condutas éticas, conhecimento dos métodos de diagnósticos empregados em cada situação. A ICSI é uma das mais tecnologias de reprodução assistida que pode ser utilizada para a reprodução de homens oligozoospermicos graves e azoospermicos. No campo da infertilidade masculina, sobretudo com as anormalidades cromossômicas, o aconselhador genético deve utilizar-se de protocolo específico para a orientação não diretiva na decisão dos meios de tratamento que podem beneficiar na aquisição de uma gravidez normal como também na orientação na transmissão de mutações e cromossomos anormais nos seus descendentes. **PALAVRAS-CHAVE:** Aconselhamento Genético, ICSI, Anomalias Cromossômicas, Infertilidade masculina.

CHROMOSOMIC ABNORMALITIES AND MALE INFERTILITY: GENETIC COUNSELING AND ICSI

ABSTRACT: Chromosomal abnormalities arise mainly during meiotic and/or mitotic processes,

modifying the amount or structure of chromosomes in cells. In mammals, the Y chromosome is essential for sex determination, early gender differentiation and spermatogenesis control. A variety of cytogenetic abnormalities are associated with spermatogenesis disorders resulting from decreased fertility or male infertility, such as oligozoospermia and azoospermia. Genetic counseling is defined as a communication process regarding the occurrence and risk of recurrence of a genetic disease in a family. It engages in a comprehensive study of genetics with various protocols, ethical conduct, knowledge of diagnostic methods used in each situation. ICSI is one of the assisted reproductive technologies that can be used for the reproduction of severe oligozoospermic and azoospermic males. In the field of male infertility, especially with chromosomal abnormalities, the genetic counselor must use a specific protocol for non directive guidance when deciding on the means of treatment that can benefit in the acquisition of a normal pregnancy as well as guidance in the transmission of mutations and abnormal chromosomes in their descendants.

KEYWORDS: Genetic counseling, ICSI, Chromosomal Anomalies, Male infertility

1 | INTRODUÇÃO

Uma variedade de anormalidades citogenéticas está associada com perturbações da espermatogênese resultantes da diminuição da fertilidade masculina. Uma revisão de dados de 11 pesquisas de 9.766 homens inférteis com oligozoospermia e azoospermia revelou uma incidência de 5,8% de anomalias cromossômicas. Anomalias dos cromossomos sexuais foram predominantes em homens inférteis azoospermicos e oligospermicos com uma incidência de 4,2%, enquanto que as anomalias autossômicas foram observadas em apenas 1,5% das populações combinadas. Estas frequências foram significativamente maiores do que os 0,38% da incidência de anomalias cromossômicas encontradas em uma série de triagens citogenéticas neonatais. A incidência de anomalias cromossômicas sexuais e autossômicas em triagens neonatal foi de 0,14% e 0,25%, respectivamente (BARROS *et al.*, 2020).

Em um comentário publicado na literatura os dados reunidos a partir de seis pesquisas citogenéticas de homens com azoospermia e cinco pesquisas citogenéticas de homens com oligozoospermia (BARROS *et al.*, 2020) revelaram uma incidência de anomalias citogenéticas em 13,7% e 4,6% da população, respectivamente. A síndrome de Klinefelter (47,XXY) e mosaico de Klinefelter (46,XY/47,XXY) foram as anomalias predominantemente observadas em 10,8% dos homens com azoospermia. As anomalias dos cromossomos sexuais não-Klinefelter e anomalias autossômicas foram observadas em apenas 1,8% e 1,1% dos homens com azoospermia, respectivamente. Na população de oligozoospermicos, as anomalias autossômicas foram relatadas em 3% dos homens e as anomalias dos cromossomos sexuais foram observados em apenas 1,6% da população.

Diante destas circunstâncias dentre outras tantas relacionadas à infertilidade humana vivenciamos nas últimas décadas um avanço das pesquisas e tecnologias em reprodução assistida na expectativa de viabilizar a reprodução humana (SAKKAS *et al.*, 2015). Considerando a complexidade de fatores envolvidos a figura do conselheiro genético se torna

fundamental. Seu papel, de um modo geral, é entrevistar pacientes e conhecer as histórias das famílias de cada cônjuge. Abordar, além das questões relacionadas à infertilidade masculina, as questões relacionadas à infertilidade feminina como é o caso da idade materna avançada, e discutir os riscos genéticos de ICSI e outras manipulações de gametas e embriões. Recomendar a triagem genética quando necessário e oferecer aconselhamento genético antes e depois da triagem considerando as informações obtidas a partir dos testes genéticos (KOHN *et al.*, 2015). Especificamente com relação à infertilidade masculina, o conselheiro deve considerar ainda, o rastreamento de etiologia genética fundamental, particularmente análise cromossômica para rearranjos de alterações numéricas e estruturais, deleções ou mutações do cromossomo Y e teste para portador de fibrose cística para todos os pacientes com ausência congênita bilateral dos vasos deferentes (BARROS *et al.*, 2020).

Com tudo o objetivo do trabalho foi revisar a literatura a respeito da infertilidade masculina provocada pelas anormalidades cromossômicas e o aconselhamento genético para a reprodução assistida por meio de ICSI.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão bibliográfica de literatura especializada sobre as principais anormalidades cromossômicas que apresentam como infertilidade masculina e como deve ser realizado o aconselhamento genético para reprodução assistida por meio de ICSI. Foi realizado um levantamento bibliográfico nas bases de dados Google Scholar, *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), PubMed até o ano de 2021, que permite o uso de terminologia comum em inglês, português e alemão, utilizando os descritores: Aconselhamento Genético, ICSI, infertilidade masculina, Anomalias Cromossômicas.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Anormalidades cromossômicas surgem principalmente durante os processos meióticos e/ou mitóticos modificando, ou não, a quantidade de cromossomos de uma célula, determinando o aparecimento de quantidades de cromossomos anormais, ou alterações nas estruturas dos cromossomos. Nos mamíferos, o cromossomo Y é essencial para a determinação do sexo, diferenciação precoce de gênero e controle da espermatogênese (ISHIKAWA *et al.*, 2007).

3.1.1 CONDIÇÕES ANEUPLÓIDES: 47,XXY (SÍNDROME DE KLINEFELTER) E 47,XYY

Estudos indicam que cerca de 80% dos homens com síndrome de Klinefelter (SK) têm o cariótipo 47,XXY e 20%, aneuploidias cromossômicas de alto grau, mosaicismo 46,XY /

47,XXY, ou cromossomo X estruturalmente anormal. Com uma prevalência estimada de cerca de 1 em 600 homens recém-nascidos, a SK é a anomalia de cromossomo sexual mais comum. Ela está entre as causas genéticas mais frequentes de infertilidade humana, ocorrendo em 11% dos homens com azoospermia e 4% de homens inférteis apresentam o fenótipo clássico da SK, que é bastante conhecido, mas muitos indivíduos afetados apresentam apenas sinais muito discretos. Consequentemente, a doença é subdiagnosticada; Apenas cerca de 25% dos homens adultos recebem diagnósticos e menos de 10% do número esperado são diagnosticados antes da puberdade (WIKSTRÖM *et al.*, 2011).

Na maioria das vezes, a única esperança de paternidade biológica em casais SK é extração testicular de espermatozoides (TESE) combinada com injeção intracitoplasmática do espermatozoide (ICSI). Até a data, já se relatou que mais de 100 crianças nasceram saudáveis após ICSI com espermatozoide testicular de homens SK não mosaico. A taxa de sucesso inicial de TESE nos homens adultos 47,XXY em pequenos estudos foi de 40 a 50%. Até o momento, uma nova técnica chamada microdissecção testicular (MICRO-TESE) demonstrou taxas significativamente melhores de recuperação de espermatozoides em comparação com a TESE convencional. As diferenças das taxas de recuperação de espermatozoides foram além de 70% em comparação com a TESE convencional, portanto, esta técnica deve ser favorecida em vez da TESE. Taxas de nascidos vivos de 20 a 46% foram relatadas, uma vez que o espermatozoide é obtido. No homem SK, o único fator preditivo para a recuperação bem-sucedida do espermatozoide parece ser a histopatologia testicular, mas, mesmo com nenhum espermatozoide em cortes histológicos, a TESE tem sido bem-sucedida. Nem ultrassonografia testicular, extensa análise cromossômica, grau de virilização, volume testicular, nem soro de testosterona, FSH, LH, nem nível de inibina B é preditivo para o resultado da TESE; assim, mesmo os pacientes com níveis de inibina B imensurável foram sujeitos a TESE bem-sucedida (WIKSTRÖM *et al.*, 2011).

Em meninos com SK, o número de espermatogônias adultas tipo Ad - de importância fundamental para o desenvolvimento da fertilidade masculina - é marcadamente reduzido e indica um potencial de fertilidade severamente prejudicado, mesmo antes da puberdade. A criopreservação de sêmen contendo números muito baixos de espermatozoides de meninos SK em puberdade precoce é possível e deve ser adequadamente oferecida aos pacientes antes do início da suplementação de testosterona. A taxa de sucesso esperado é, no entanto, extremamente baixa porque desde o início da puberdade evidencia-se uma aceleração acentuada na depleção de células germinativas, além disso, a capacidade dos meninos para fornecer amostras de sêmen durante a puberdade precoce é limitada. Outra opção seria TESE, se a amostra de biópsia contiver células germinativas haploides (WIKSTRÖM *et al.*, 2011).

3.1.2 CARIÓTIPO 47, XYY

Muitos homens com cariótipo 47,XYY são férteis, apesar da anormalidade cromossômica sexual. Alguns pesquisadores têm sugerido que o cromossomo Y extra é perdido antes da meiose partena, conservando assim a fertilidade nestes pacientes. Estudos comparando a aneuploidia dos espermatozoides entre homens 47,XYY férteis e inférteis revelam que a maior parte dos espermatozoides produzidos por estes homens tem cariótipo normal. Um ponto de impedimento para as células germinativas geneticamente anormais pode residir nos espermatócitos ou espermátides nas fases primária e secundária de desenvolvimento que conduzem a uma eliminação contínua dessas células durante a espermatogênese. Isso pode causar vários graus de parada de maturação, bem como as concentrações de espermatozoides heterogêneos vistas em homens com anomalias genéticas (KIM *et al.*, 2013).

Por outro lado, vários estudos demonstram homens 47,XYY com uma porcentagem significativa de mosaicismos no sêmen, aneuploidia, ou hiperdiploidia, variando de 0,57% a 77,8%. O aumento da taxa de dissomia YY em homens com o cariótipo 47,XYY transmite células hiperdiploides particulares que podem sofrer divisão meiótica. Foi levantada a hipótese de que as células com dissomia YY surgem por causa de pares bivalentes YY na meiose I que deixam o univalente X livre, eliminando-o na anáfase. Estes espermatozoides podem sofrer divisão meiótica, aumentando assim o risco de transmissão genética anormal à prole (KIM *et al.*, 2013).

3.1.3 TRANSLOCAÇÕES AUTOSSÔMICAS DO X E AUTOSSÔMICAS DO Y

Em homens com oligozoospermia e azoospermia inexplicável, anormalidades genéticas foram identificadas, incluindo anormalidades cromossômicas e deleções (del) da região do fator de azoospermia (AZF) do cromossomo Y. Além de algumas exceções associadas com fenótipos férteis ou subférteis, translocações Y/autossomo geralmente levam à infertilidade masculina (ISHIKAWA *et al.*, 2007).

Em translocações X/autossomo no sexo masculino, a azoospermia é o achado mais frequente, embora alguns poucos casos tenham sido relatados com oligozoospermia severa. A falha espermatogenética de uma translocação X/autossomo é muito mais sensível às interrupções meióticas do que na oogênese, devido a uma série de checkpoints no ciclo celular da meiose. Alguns estudos meióticos de homens inférteis que possuem rearranjos cromossômicos sugeriram que a falha meiótica observada nesses pacientes pode estar ligada a uma interação entre o “sex body” e o rearranjo (ISHIKAWA *et al.*, 2007).

3.1.4 TRANSLOCAÇÕES AUTOSSÔMICAS RECÍPROCAS

Translocações recíprocas de cromossomos autossômicos estão presentes em cerca

de 1/625 homens, mas muitas vezes não há sintomas, exceto infertilidade primária. Um estudo relatou um homem de 37 anos de idade e sua mulher com 39 anos que se queixava de infertilidade primária. A Fertilização in vitro (FIV) resultou na gravidez, mas dois abortos espontâneos. Após testes cromossômicos, o homem foi diagnosticado com uma translocação recíproca e sua esposa foi diagnosticada com mosaico de síndrome de Turner. Através de TESE e FIV com PGD, eles conseguiram ter dois filhos saudáveis (KOHN *et al.*, 2015).

As translocações balanceadas são mais comumente em casais que tiveram dois ou mais abortos espontâneos e em homens inférteis do que na população em geral. Os portadores de translocação recíproca balanceada se pareiam na meiose e na anáfase, os cromossomos se segregam a partir de três configurações (Alternada, adjacente-1 e adjacente-2). Assim, leva a gametas balanceados, desbalanceados e normais. Embora a segregação 2:2 é a mais comum, pode acontecer a segregação 3:1, levando a uma trissomia ou monossomia (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

3.1.5 TRANSLOCAÇÕES ROBERTSONIANAS

Translocações Robertsonianas são anomalias cromossômicas mais comuns entre homens inférteis, caracterizado pela fusão cêntrica de dois dos cromossomos acrocêntricos (cromossomos 13, 14, 15, 21, 22) e resultando em um cariótipo de 45 cromossomos. As mais frequentes reorganizações são t (13q; 14q) e t (14q; 21q), com uma frequência estimada de 0,97% e 0,20%, respectivamente. Recentemente, em um estudo de SOBOTKA *et al.* (2015) foi encontrado uma translocação Robertsoniana rara entre o 14 e 22 caracterizado por azoospermia, defeitos meióticos e aneuploidia testicular do esperma. Desde 1976, vários estudos têm demonstrado que os portadores de anomalias cromossômicas, especialmente translocações, têm uma espermatogênese alterada caracterizada por oligozoospermia grave. Além disso, as anomalias ultra estruturais incomuns de espermatozoides relacionadas com a imaturidade foram observadas em portadores de translocação Robertsoniana. Alterações espermatogênicas podem ser consequência de anomalia no emparelhamento dos cromossomos reorganizados durante a prófase I da meiose originando uma configuração trivalente que propicia a segregação de forma alternada, produzindo espermatozoide normal ou equilibrado. Espermatozóides desequilibrados são gerados por um padrão de segregação adjacente e que poderiam ser responsáveis por abortos espontâneos ou descendentes aneuplóides. Em portadores de translocações Robertsonianas a análise de hibridização fluorescente in situ (FISH) demonstrou uma porcentagem de espermatozoide normal ou equilibrado que vão desde 73,6% até 91%. Contrastando resultados que mostram uma elevada porcentagem de espermatozoides desequilibrados derivados de segregação adjacente variando de 3% a 36% (PIOMBONI *et al.*, 2014).

3.1.6 RISCOS DE ICSI PARA HOMENS PORTADORES DE TRANSLOCAÇÕES CROMOSSÔMICAS

A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ao contrário da fertilização *in vitro*, que necessita de uma quantidade e qualidade ótimas de espermatozoides para o sucesso da fertilização, é uma técnica de micromanipulação que envolve a injeção direta de espermatozóide no oócito. A ICSI pode ser realizada com semem fresco ou criopreservado. Entretanto, apesar da larga aplicação desta técnica, falta consenso relacionado às implicações genéticas da ICSI e eficácia do diagnóstico pré-implantacional na reprodução assistida. Além disso, o aumento das evidências de fatores genéticos envolvidos com a infertilidade masculina e o risco potencial de transmissão de desordens genéticas à prole gera uma preocupação maior com relação à segurança da técnica (MERCHANT *et al.*, 2011).

Portadores de translocações equilibradas, tanto recíprocas quanto Robertsonianas, não têm necessariamente infertilidade ou fenótipos anormais. No entanto, como as translocações interferem com o pareamento e segregação nos cromossomos normais na meiose I, existe um potencial para formação de gametas desbalanceados e subsequentemente descendentes anormais desbalanceados. Em portadores de translocações equilibradas, a espermatogênese resulta na produção de três combinações de gametas, normais, balanceados anormais e desbalanceados anormais. As primeiras duas combinações podem levar a prole fenotipicamente normal; contudo, a última combinação pode produzir concepções desequilibradas contendo uma duplicação e uma deleção de segmentos dos cromossomos (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

KISS *et al.* (2009) relataram os resultados de seu programa de rastreamento de cariótipo de todos os casais com infertilidade masculina grave e sua prole derivada de ICSI. Nos 261 casais atendidos, 11 homens (4,2%) e 3 mulheres (1,2%) tinham cariótipo anormal, todos consistindo de anomalias cromossômicas estruturais. Os 11 homens cromossomicamente anormais tinham seis translocações Robertsonianas 13q14q, duas translocações autossômicas, duas inversões autossômicas e um cromossomo marcador. Nas 83 gestações concebidas por ICSI, oito fetos foram produzidos a partir dos 14 casais com portadores de anomalias cromossômicas estruturais. Três dos oito filhos eram normais e cinco fetos herdou as anormalidades cromossômicas idênticas às encontrados em seus pais. KISS *et al.* (2009) concluíram que a prole cromossomicamente normal pode ser concebida através de ICSI para portadores inférteis de translocações cromossômicas balanceadas. Além disso, os investigadores recomendaram fortemente que o cariótipo deve ser realizado em todos os homens inférteis antes de iniciar a ICSI e o diagnóstico pré-natal deve ser oferecido para todas as gestações derivados de ICSI (MARQUI, 2018).

3.1.7 INVERSÕES

Inversão pericêntrica é um rearranjo cromossômico estrutural, que é o resultado de

duas quebras de ambos os lados do centrômero em um único cromossomo e é seguida por uma rotação de 180° e reintegração do segmento invertido no mesmo cromossomo. Na população em geral, a frequência de inversões pericêntricas é estimada como sendo variável a partir de 0,089% a 0,34%, ou mesmo a 1-2%. A maioria das inversões pericêntricas afeta a própria região pericêntrica do cromossomo 2 e a região heterocromática dos cromossomos 1, 9, 16 ou Y, que são consideradas como polimorfismos não-patológicos. Geralmente, os portadores de inversões pericêntricas não mostram alteração fenotípica, mas eles podem ter riscos para a fertilidade, tais como a produção de gametas cromossomicamente desbalanceados e / ou insuficiência espermatogênética causada pela reorganização cromossômica. Durante a meiose, o emparelhamento total de um invertido e seus cromossomos homólogos normais requer a formação de um circuito de inversão, o que pode produzir dois gametas anormais com ambos segmentos de cromossomos duplicados e deletados para as regiões distais à inversão [duplicação p / eliminação q (dup p / del q) ou eliminação p / q duplicação (del p / q dup)] (LUO *et al.*, 2014).

3.1.8 CROMOSSOMOS MARCADORES SUPRANUMERÁRIOS E ANÉIS

Pequenos cromossomos marcadores supranumerários (SSMC) são cromossomos muito pequenos e não identificados que são ocasionalmente observados em preparações de cromossomos, geralmente em mosaicismo e estão em adição aos cromossomos normais (NUSSBAUM *et al.*, 2008). Eles são encontrados quatro vezes mais frequentemente em fenótipos de subfertilidade em comparação com a população em geral. A razão para esta observação ainda é incerta. No entanto, sugere-se uma ligação de arquitetura da intérfase e a função do genoma. Um estudo revelou que a presença de SSMC influencia a arquitetura nuclear de células do sangue periférico e fibroblastos, levando à hipótese de que os SSMC poderiam ter efeitos semelhantes em células de espermatozoide, possivelmente levando à infertilidade (KARAMYSHEVA *et al.*, 2015).

A configuração em anel dos cromossomos foi observada como uma alteração estrutural possível de ocorrer em todos os cromossomos. Esta alteração geralmente resulta de quebras das partes terminais em ambos os braços do cromossomo, seguindo por fusão das extremidades quebradas. Como consequência pode-se obter: nenhuma perda de material genético e a formação de um completo cromossomo em anel, ou a perda de material genético que pode resultar na síndrome de microdeleção subtelomérica. Um cromossomo em anel também pode resultar a partir da fusão dos telômero de um cromossomo inerentemente instável propenso a circularização. (RAJESH *et al.*, 2011).

3.1.9 DELEÇÕES YQ11 E OS AZFS

Segundo POONGOTHAI *et al.*, (2009) O cromossomo Y é um dos menores cromossomos humanos e consiste de um braço curto (Yp) e um longo (Yq). O cromossomo Y possui 60 megabases (MB) em tamanho, 60 milhões de nucleotídeos. Dos 27 genes dos cromossomos Y identificados, nove estão localizados no Yp e o 18 no Yq. As regiões pseudoautossômicas (PARS), que pareiam com o cromossomo X durante a meiose, estão localizadas em ambas as extremidades do cromossomo Y. A região exterior da PARS que não recombinam é chamada de região de não recombinação do cromossomo Y (NRY). O Yp e a parte proximal da Yq consistem de eucromatina, enquanto que a parte distal do Yq é composta de heterocromatina e esta região pode variar em comprimento para constituir cerca de metade a dois terços da Yq. Portanto, o Yq pode ser citogeneticamente dividido em uma região proximal eucromática (Yq11, subdividida em Yq11.1, 11,21, 11,22 e 11,23) e uma região distal heterocromática (Yq12), enquanto que o braço curto eucromático é chamado de Yp11. Recentemente, os métodos moleculares identificaram os loci envolvidos na produção e diferenciação do esperma. O cromossomo Y foi dividido em sete intervalos de deleção. Cada um destes intervalos é subdividido em sub-intervalos (A, B, C, etc.).

Em 1976, Tiepolo e Zuffardi foram os primeiros a hipotetizar uma relação entre deleções do cromossomo Y e infertilidade masculina. As microdeleções Yq foram detectados em 5% a 15% dos homens com falha na espermatogênese. Essas deleções incluem o bloqueio total da heterocromatina Yq12 e parte da eucromatina adjacente da Yq (Yq11.23) e estão agrupados dentro dos intervalos de 5 e 6 do cromossomo Y. Conseqüentemente foi postulado que pelo menos um fator genético do cromossomo Y, essencial para o desenvolvimento de células germinativas do homem, está localizado no Yq11 distal. Ele foi definido como o gene fértil Y suportado ou fator de azoospermia (AZF). A região AZF é subdividida em três regiões de ponto de acesso que não se sobrepõem definidos como AZFa, AZFb e AZFc. Além disso, recentemente, uma quarta região, AZFd, foi proposta entre AZFb e AZFc. Até agora, pelo menos, 12 genes foram isolados a partir destas regiões. Vários genes localizados nas regiões AZF estão expressos nos testículos e poderia, portanto, ser visto como “genes candidatos AZF” (POONGOTHAI *et al.*, 2009).

Seguindo o aconselhamento genético sobre os problemas nas regiões do cromossomo Y, a maioria dos casais ainda prossegue com a FIV utilizando tanto os espermatozoides do parceiro masculino quanto espermatozoides de doadores. Em um pequeno número de casos, os casais têm usado PGD para selecionar embriões do sexo feminino para a transferência, em uma tentativa de evitar a transmissão da anomalia genética a seus filhos, enquanto outros pacientes optam pela adoção de embrião (POONGOTHAI *et al.*, 2009).

Ainda segundo POONGOTHAI *et al.*, (2009) haverá uma maior sobreposição entre a medicina reprodutiva e genética e é imperativo que os profissionais que trabalham nesses dois campos, colaborem estreitamente para tratar pacientes com infertilidade da melhor

maneira possível.

3.1.10 ACONSELHAMENTO GENÉTICO, TRIAGEM DE CARIÓTIPO E TESTES DE MICRODELEÇÕES DO AZF.

A definição de aconselhamento genético é fornecida pela National Society of Genetic Counselors, dos Estados Unidos (2006), estabelecendo que o aconselhamento genético é o processo de ajudar as pessoas a compreender e se adaptar às implicações médicas, psicológicas e familiares decorrentes da contribuição genética para a enfermidade. Também, engloba a interpretação das histórias clínicas e familiares para avaliar a probabilidade de ocorrência ou recorrência da doença; a educação a respeito de hereditariedade, exames, tratamento, prevenção, ajuda e pesquisa; e o aconselhamento adequado para promover escolhas conscientes e adaptação à condição de risco.

Homens inférteis 46,XY considerando ICSI devem receber aconselhamento genético em relação aos seus riscos de ter uma microdeleção em AZF, que poderia ser a causa de sua infertilidade e que a microdeleção poderia ser transmitida a seus filhos, provavelmente resultando em sua futura infertilidade. Os homens devem ter a oportunidade de serem examinados para microdeleções na região AZF. Ainda precisarão saber que os homens inférteis não mosaicos que carregam microdeleções AZF em seu DNA extraído de leucócitos irão transmitir a mutação para todos os seus filhos (KISS *et al.* 2009).

Se o mosaïcismo gonadal é prevalente na população masculina estéril selecionada, então o risco de transmissão de cada indivíduo de uma microdeleção é maior do que a incidência geralmente citada de 18%. A transmissão de mutações em homens com mosaïcismo gonadal depende da razão do Y intacto para os cromossomos de Y mutantes na sua linha germinal. Borges e Macedo (2016) propuseram que a gestão dos homens inférteis com possível mosaïcismo com microdeleção AZF gonadal seria melhorada com diagnóstico genético pré- implantacional. O diagnóstico pré-implantacional iria permitir a separação de embriões gerados por ICSI carregando microdeleções AZF de embriões com os cromossomos Y intactos antes da transferência de embriões não afetado para o útero. (ARMBRUSTER, QUAYLE, 2016).

4 | CONCLUSÃO

O capítulo revela que há um risco maior de homens inférteis carregarem e transmitirem para a sua prole anormalidades cromossômicas significativas, no entanto, oferece a ICSI como uma nova forma de viabilizar a reprodução destes pacientes. Além disso, o capítulo revela que o aconselhamento genético deve levar os pacientes a compreenderem melhor as suas anormalidades genéticas. O aconselhamento genético visa um tipo de abordagem que facilita a estes pacientes melhores compreensões às implicações médicas, sociais e psicológicas em que estão envolvidos, o que evidencia uma crescente necessidade de

aconselheiros genéticos na população, em especial, que ofereçam suporte ao trabalho das clínicas de reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

ARMBRUSTER, E; QUAYLE, J. **Aconselhamento Genético. Academia Accelerating The World's Research**, [s. l], p. 2-17, 2016.

BARROS, B. M ; SANTOS, T. S; CARVALHO, C. **infertilidade masculina de origem genética: uma revisão sistemática. Rev. Ciên. Saúde**, [s. l], v. 5, n. 2, p. 20-27, 2020

BORGES, C.H.S; MACEDO, L.C. **Infertilidade masculina decorrente de microdeleções no cromossomo Y. Reprodução & Climatério**, [S.L.], v. 31, n. 3,p. 169-174 ,set. 2016. ElsevierBV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2015.12.006>.

ISHIKAWA, T.; KONDO, Y.; YAMAGUCHI, K.; OBA, T.; SAKAMOTO, Y.; TAKENAKA, A.; FUJISAWA, M. **An unusual reciprocal X-autosome translocation in an infertile azoospermic man**. *Fertil Steril*. 2007 Sep;88(3):705.e15-7. Epub 2007 Mar 26.

KARAMYSHEVA, T.; KOSYAKOVA, N.; GUEDICHE, N.; LIEHR, T. **Small supernumerary marker chromosomes and the nuclear architecture of sperm - a study in a fertile and an infertile brother**. *Syst Biol Reprod Med*. 2015 Jan;61(1):32-6.

KIM, I.W.; KHADILKAR, A.C.; KO, E.Y.; SABANEKH, E.S. JR. **47,XXX Syndrome and Male Infertility**. *Rev Urol*. 2013;15(4):188-96.

KISS, A; ROSA, R.F.M; DIBI, R.P; ZEN, P.R.G; PFEIL, J.N; GRAZIADIO, C; PASKULIN, G.A. **Anormalidades cromossômicas em casais com história de aborto recorrente. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 68-74, fev. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-72032009000200004>.

KOHN, T.P.; CLAVIJO, R.; RAMASAMY, R.; HAKKY, T.; CANDRASHEKAR, A.; LAMB, D.J.; LIPSHULTZ, L.I. **Reproductive outcomes in men with karyotype abnormalities: Case report and review of the literature**. *Can Urol Assoc J*. 2015 Sep-Oct;9(9- 10):E667-70.

LUO, Y.; XU, C.; SUN, Y.; WANG, L.; CHEN, S.; JIN, F. **Different segregation patterns in five carriers due to a pericentric inversion of chromosome 1**. *Syst Biol Reprod Med*. 2014 Dec;60(6):367-72.

MARQUI, A. B. T. **Chromosomal abnormalities in recurrent miscarriages by conventional karyotyping analysis. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 265-276, jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1806-93042018000200002>.

MERCHANT R, GANDHI G, ALLAHBADIA G N. **In vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection for male infertility. Indian J Urol**. 2011 Jan-Mar; 27(1): 121–132.

NATIONAL SOCIETY OF GENETIC COUNSELORS' DEFINITION TASK FORCE, RESTA R, BIESECKER, B.; BENNETT, R.; BLUM, S; HAHN, S. et al. **A new definition of Genetic Counseling**: National Society of Genetic Counselors' Task Force report. *J Genet Couns*. 2006; 15(2):77–83.

NUSSBAUM, R.I.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Thompson e Thompson: **genética médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008

PIOMBONI, P.; STENDARDI, A.; GAMBERA, L. **Chromosomal aberrations and aneuploidies of spermatozoa**. *Adv Exp Med Biol*. 2014;791:27-52

POONGOTHAI, J.; GOPENATH, T.S.; MANONAYAKI, S. **Genetics of human male infertility**. *Singapore Med J*. 2009 Apr;50(4):336-47.

RAJESH, H.; FRECKMANN, M.L.; CHAPMAN, M. **Azoospermia and paternal autosomal ring chromosomes: case report and literature review**. *Reprod Biomed Online*. 2011 Oct;23(4):466-70.

SAKKAS D, RAMALINGAM M, GARRIDO N, BARRATT CL. **Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes?** *Hum Reprod Update*. 2015 Nov-Dec;21(6):711-26. doi: 10.1093/humupd/dmv042. Epub 2015 Sep 19.

SOBOTKA, V.; VOZDOVA, M.; HERACEK, J.; RUBES, J. **A rare Robertsonian translocation rob(14;22) carrier with azoospermia, meiotic defects, and testicular sperm aneuploidy**. *Syst Biol Reprod Med*. 2015;61(4):245-50.

WIKSTRÖM, A.M.; DUNKEL, L. Klinefelter syndrome. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. 2011 Apr;25(2):239-50.

CAPÍTULO 2

APLICAÇÕES DA GENÉTICA MOLECULAR NA CIÊNCIA FORENSE - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Data de aceite: 01/10/2021

Data de submissão 08/07/21

Cássia Pereira da Silva

Universidade Federal de Catalão – UFCAT
Catalão – Goiás
lattes.cnpq.br/3464760673101330

Milena Martins do Nascimento

Universidade Federal de Catalão – UFCAT
Catalão – Goiás
lattes.cnpq.br/0433856982613271

Adriana Freitas Neves

Universidade Federal de Catalão – UFCAT
Catalão – Goiás
lattes.cnpq.br/2984939300978146

RESUMO: Os grandes avanços nas várias áreas da ciência desde o século XX até os dias atuais repercutiram diretamente no campo da ciência forense. Dentre estas áreas está a genética molecular, a qual proporciona uma gama de conhecimentos e técnicas imprescindíveis para as investigações na identificação de indivíduos. No presente estudo foi realizada uma revisão sobre este assunto focando nas aplicações da genética molecular na ciência forense e suas contribuições nas esferas civil e criminal. Com o desenvolvimento das técnicas de reação em cadeia da polimerase, seqüenciamento automatizado do DNA e as análises dos marcadores moleculares baseados em polimorfismos do tipo VNTRs, STRs e SNPs, as análises genéticas de DNA tornaram-se ferramentas poderosas e essenciais

para a identificação pessoal e em investigações de vínculo genético, sendo essenciais no esclarecimento da identidade em análises forenses.

PALAVRAS-CHAVE: ciência forense; genética molecular; técnicas moleculares.

APPLICATIONS OF MOLECULAR GENETICS IN FORENSIC SCIENCE – BIBLIOGRAPHIC REVIEW

ABSTRACT: The great advances in some areas of science from the 20th century to the present day had direct repercussions in the field of forensic science. Among these areas is molecular genetics, which provides a range of essential knowledge and techniques for individual investigations. In the present study, a review about this subject focusing on the applications of molecular genetics in forensic science and its contributions in the civil and criminal spheres. With the development of polymerase chain reaction, automated DNA sequencing techniques and the analysis of molecular markers based on polymorphisms such as VNTRs, STRs and SNPs, genetic DNA analysis has become powerful and essential tools for personal identification, genetic investigations, being essential in clarifying the individual identity in forensic analysis.

KEYWORDS: DNA, polymorphisms, allelic discrimination, techniques.

1 | INTRODUÇÃO

A genética forense é considerada como

uma das importantes competências adotadas pela ciência forense, apresentando sua significância nas investigações criminais e testes de parentescos (MIOZZO, M., 2019). Nos laboratórios criminais, as aplicações de técnicas da biologia molecular estão sendo cada vez mais utilizadas, visto que esta ciência possui uma gigantesca capacidade de identificação de indivíduos a partir de vestígios deixados nos locais de crimes ou nos corpos das vítimas, como pêlos, fluídos corporais, manchas de sangue, sêmen, dentre outros materiais geneticamente identificáveis (LEITE, V. 2013; MIOZZO, M., 2019). Portanto, através do estudo de amostras biológicas, a genética forense visa à obtenção de perfis genéticos. A partir desta obtenção, a identificação e comparação entre determinados perfis poderá auxiliar no âmbito dos tribunais de justiça (AMORIM, A. 2015).

Acredita-se que a genética forense começou a se estabelecer no ano de 1985, a partir das pesquisas e investigações de Alec Jeffreys sobre marcadores moleculares polimórficos (GILL; JEFFREYS; WERRETT, 1985). No Brasil, os esforços para a implementação das análises de DNA começaram em 1992 pela polícia técnica do distrito federal. Em dezembro de 1994, a legislação brasileira aceitou as análises de DNA em investigações criminais ao aprovar a lei n.º 803 criando a “Divisão de Pesquisa de DNA forense (DP/DNA)” da Polícia Civil do Distrito Federal (BRASIL, 2003).

Portanto, diante dos conhecimentos gerados nos últimos anos acerca da ciência forense e da sua potencial aplicação nas investigações criminais são de suma importância a elaboração e publicação de conteúdos detalhados sobre esta área. Contudo, o presente trabalho objetivou relatar, mediante uma revisão bibliográfica, as aplicações e contribuições da Genética Molecular na ciência forense, assim como a importância destas na área civil e criminal.

2 | TÉCNICAS MOLECULARES

2.1 Southern Blot: enzimas de restrição, eletroforese e análises

As técnicas moleculares de clonagem e o seqüenciamento de DNA podem depender do uso de enzimas sítio-específicas, denominadas endonucleases de restrição. As enzimas de restrição são equiparadas a tesouras moleculares por cortarem as fitas de DNA em seqüências-alvo específicas de nucleotídeos resultando em fragmentos de restrição (SNUSTAD; SIMMONS, 2008). Este procedimento consiste em colocar os fragmentos em um pequeno poço em gel (agarose ou acrilamida), que é colocado em um campo elétrico e solução tampão. A eletricidade faz com que os fragmentos migrem para o pólo positivo da cuba de eletroforese (GRIFFITHS et al., 2008; NEVES, 2017).

Após a eletroforese, os fragmentos separados são submetidos ao procedimento conhecido como transferência de *Southern*. O gel é colocado em uma solução alcalina, promovendo a desnaturação do DNA e assim, o transferindo para uma membrana de náilon (transferências chamadas de *Southern blot* - manchas). Uma sonda radioativa ou

quimioluminescente de DNA contendo a seqüência de interesse que se hibridiza a uma seqüência complementar de DNA, do tipo VNTRs (do inglês, *Variable Number of Tandem Repeats*). A membrana é exposta a um filme de raios-X, que detecta o sinal emitido pela quebra do substrato pela sonda marcada resultando em bandas escuras que mostram as posições das seqüências de DNA que se hibridizaram com a sonda (BROWN, 2001; NEVES, 2017). Essa característica permite a individualização, com exceção de gêmeos idênticos e um modelo semelhante ao que foi descrito foi empregado por Jeffreys, em 1985, que utilizou o termo *DNA fingerprinting* para definir esses padrões individuais (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985a; 1985b; GRIFFITHS et al., 2008).

2.2 Reação em cadeia da polimerase e eletroforese capilar

Desenvolvida por Kary Mullis, a técnica de reação em cadeia da polimerase ou PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) pode amplificar uma região de DNA por ciclos repetidos de síntese de DNA, *in vitro*, em poucas horas (SAIKI et al., 1985; MELLO; FONSECA-COSTA, 2005). A PCR possui enorme aplicação na área forense e criminalística pelo fato de se tornar uma grande ferramenta na investigação de marcadores moleculares e permitir analisar casos de identidades contestáveis utilizando até mesmo seqüências de DNA degradadas, ou fontes escassas de ácidos nucléicos (NEVES, 2017; DALE; GREENSPAN; OROKOS, 2006).

Após o DNA ser extraído e quantificado, ele poderá passar pela PCR em um aparelho termociclador automatizado. Esta técnica é basicamente dividida em três passos que se repetem dezenas de vezes: desnaturação do DNA, anelamento de primers e extensão da fita nova de DNA pela enzima DNA polimerase. A desnaturação ocorre quando a temperatura está a cerca de 95°C, separando a molécula de DNA em duas fitas. O alinhamento e união ocorrem entre 50-65°C, onde os primers se ligam nas fitas de DNA que foram anteriormente separadas. O ciclo finaliza com a temperatura em cerca de 72°C, em que a polimerase irá adicionar os nucleotídeos na extremidade 3-OH' livre do primer, levando a extensão da região de interesse e formando uma nova fita complementar à fita molde (MIOZZO, M., 2019; NEVES, 2017).

Após a amplificação do alvo, os produtos da PCR podem ser analisados pela técnica de eletroforese com gel de agarose, um dos mais simples métodos de detecção de um produto de DNA, corado com corantes fluorescentes intercalantes de bases, como o brometo de etídio, sendo os produtos visualizados em luz ultravioleta. Em gel de poliacrilamida o produto poderá ser visualizado com coloração utilizando o nitrato de prata, a qual permite a detecção direta da seqüência amplificada pelo desenvolvimento de cor.

Um variação da eletroforese convencional para ácidos nucléicos é a técnica capilar cuja separação dos fragmentos alvos ocorre de acordo com o tamanho e padrão de marcação por fluoróforos específicos, normalmente feita em aparelhos de sequenciamento de DNA. Como o diâmetro do capilar é pequeno, o mesmo permite que elevadas tensões sejam utilizadas,

fazendo assim com que o calor dissipado seja eficiente e resulte em separações satisfatórias e tempo reduzido das análises. (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA, J., 2019).

2.3 PCR-STRs para análise de sequências localizadas em cromossomos humanos

As regiões do DNA curtas e repetidas de forma seqüencial ou em *tandem* conhecidas como STRs (*short tandem repeats*) ou microsatélites consistem em seqüências com menos de 350 pares de base, com unidades que variam de dois a seis nucleotídeos. Os locos STRs são abundantemente dispersos no genoma, tanto nos cromossomos autossômicos quanto nos sexuais (SILVA, 2018).

A partir de 1990, os STRs tornaram preferenciais nas tipagens de DNA de vestígios biológicos por serem passíveis de análise após a reação de PCR devido ao seu pequeno tamanho. Por serem altamente informativos e eficazes na individualização de um grande número de amostras forenses, em 1997, 13 locos STRs foram incluídos no CODIS (do inglês, *Combined DNA Index System*) sendo utilizado pelo FBI (do inglês, *Federal Bureau of Investigation*) em vários casos forenses (KASHYAP et al., 2004; NIAZI, 2007; TAMAKI, 2007). O banco de dados eletrônico CODIS foi desenvolvido pelo FBI e armazena dados de perfis de DNA provenientes de laboratórios forenses locais, estaduais e federais. Esse sistema integrado permite que os laboratórios criminais possam comparar e compartilhar dados de DNA forense (DALE, GREENSPAN; OROKOS, 2006).

Para realizar a análise de locos STRs é realizada a amplificação da região de interesse com primers específicos para cada alvo. Após amplificação, os produtos são analisados por separação eletroforética, sendo atualmente a capilar a mais utilizada, devido ao sistema fechado e rapidez na obtenção dos resultados. Os dados obtidos são analisados por *software* que determina o tamanho dos alelos STRs, permitindo a sua genotipagem, por meio da comparação dos tamanhos dos alelos de cada amostra com os da escala alélica (BUTLER et al., 2004 apud LAZARUK et al., 1998; GÓES, 2005; GARRIDO, 2009 apud BUTLER, 2005).

Algumas vantagens da PCR-STRs em relação a outras técnicas consistem na rapidez do procedimento, geralmente menos de 24 horas, na eficiência e simplificação decorrentes da amplificação simultânea dos locos STRs e automatização da coleta e análise de dados, na disponibilidade de kits comerciais capazes de amplificar de 3 a 16 locos em uma única reação e baixo custo do método, requer quantidades ínfimas de DNA para análise, permite analisar amostras de DNA degradadas, já que há maior possibilidade das seqüências curtas de DNA estarem intactas pós-degradação, o elevado poder discriminativo devido ao alto número de locos (KASHYAP et al., 2004). A fim de recuperar o máximo de informações do DNA degradado, foram desenvolvidos *primers* para amplificar seqüências STRs gerando um tamanho menor que o padrão comercial, denominados de mini-STRs. Estes se ligam o mais próximo possível da região de repetição STR, produzindo resultados mais eficientes nas

análises das amostras de DNA degradadas.

Parsons et al. (2007), evidenciaram em seus estudos que o miniplexes são vantajosos, como em casos de análises de DNA para reassociação em larga escala de partes de esqueletos misturadas provenientes de valas comuns secundárias. Dentre as limitações está a dificuldade em separar múltiplos locos pelo tamanho utilizando um mesmo fluoróforo, a necessidade de se trabalhar com um número menor de locos na reação multiplex, possível inibição da DNA polimerase e presença de DNA não humano.

As análises dos STRs dos cromossomos Y (Y-STRs) também são ferramentas valiosas por se limitarem aos indivíduos do sexo masculino, ou seja, apresentam herança na forma haplóide, hemizigota, diferentemente do resto dos cromossomos que apresentam uma cópia homóloga. Os cromossomos Y apresentam ausência de recombinação, com exceção de pequenas regiões pseudo-autossômicas, permitindo que seja realizada a patrilinearidade, uma vez que o haplótipo (bloco de alelos de diferentes STRs) da região não recombinante do cromossomo Y (*Non-Recombinant Y Chromosome* - NRY) é transmitido do pai aos seus descendentes homens até que ocorra uma mutação. Desta forma, os locos STRs no cromossomo Y são denominados marcadores de linhagem, já que são bastante informativos em relação à linhagem paterna, mas não sobre o indivíduo especificamente, ou seja, não permite a identificação de indivíduos dentro da mesma linhagem (PENA; PRADOEPPLIN, 1995; PENA; CARVALHO-SILVA; SANTOS, 1997; WALSH, 2007).

Os Y-STRs são marcadores importantes na reconstrução das relações evolutivas entre indivíduos de mesma região geográfica ou entre diferentes grupos de indivíduos e migração, por ser uma herança uniparental paterna e apresentar ausência de recombinação em sua maior parte (PENA, CARVALHO-SILVA; SANTOS, 1997; KASHYAP et al., 2004; KAYSER, 2007).

A tipagem do cromossomo Y é relevante na investigação forense, como nos casos de agressões sexuais fornecendo informação específica do esperma ou células epiteliais masculinas (na ausência de espermatozoides) e conseqüentemente do perfil do(s) estuproador(es), mesmo havendo mistura de fluidos corporais do(s) agressor(es) e da vítima (SHEWALE et al., 2003; KASHYAP et al., 2004; KAYSER, 2007). Além dos casos de estupro, a análise do cromossomo Y vem sendo empregada, na identificação da ascendência genética de um homem, na vinculação de restos mortais com seus parentes masculinos, testes de vínculo genético tanto com presença, quanto com a ausência do suposto pai (KAYSER, 2007; WALSH, 2007; CICV, 2009).

Para realizar a análise do Y-STR, o procedimento é o mesmo para os STRs autossômicos, sendo necessária a extração do DNA da amostra biológica e em seguida a PCR das seqüências alvo, geralmente multiplex, utilizando *primers* específicos marcados com fluoróforos. Após a amplificação, os produtos são submetidos à eletroforese capilar, onde os locos são separados de acordo com seus pesos moleculares e detectados por laser. Os dados serão processados pelo *software* resultando na determinação do genótipo Y-STR

(BUTLER et al., 2005; JOBIM et al., 2008).

Assim como para o cromossomo Y, a análise de marcadores STRs do cromossomo X (X-STRs) também é utilizada na ciência forense. Face ao seu poder de discriminação, os X-STRs são utilizados no intuito de complementar, de forma eficiente, a análise dos marcadores autossômicos e do cromossomo Y, principalmente em casos complexos de investigação e em vínculo de parentesco (SZIBOR et al., 2003). No entanto, em casos de alterações cromossômicas e síndrome de Turner (45, X0), fazem-se necessárias as considerações éticas (SZIBOR et al., 2007).

O cromossomo X apresenta características únicas no genoma humano, pois em indivíduos do sexo biológico feminino está presente como um par de homólogos, sendo um de origem materna e o outro paterna, embora apresentando semelhança com os cromossomos autossômicos, apenas um dos cromossomos X encontra-se ativado, sendo que o outro cromossomo é inativado conforme a hipótese de Lyon. Em contrapartida, nos indivíduos do sexo masculino, o cromossomo X está presente em estado hemizigótico, ou seja, apresenta apenas um cromossomo X de origem materna (ROSS et al., 2005).

Essa diferença de alelos evidenciada entre marcadores autossômicos e os do cromossomo X, em relação ao sexo masculino, resulta na utilização de um menor número de marcadores do cromossomo X em casos de testes de parentesco e uma maior capacidade de exclusão, uma vez que, diferentemente dos autossomos, a determinação de haplótipos torna-se facilitada no cromossomo X (em homens); o pai transfere seu haplótipo (100%) do cromossomo X para a filha, todas as irmãs apresentam o mesmo haplótipo do cromossomo X paterno, havendo a possível estabilidade dos haplótipos de grupos de ligação no decorrer das gerações, o que garante um bom mecanismo para demonstrar parentesco (SZIBOR et al., 2003).

Os X-STRs têm apresentado grande utilidade na resolução de casos deficientes de paternidade quando a criança é do sexo feminino. Os marcadores do cromossomo X mostram-se mais eficientes que os marcadores autossômicos em casos de parentesco de trios envolvendo uma filha, nos casos de duos (pai e filha) com informação ausente do genótipo materno, nos testes de maternidade duo (mãe e filho). Em casos de paternidade em trios (mãe, filho e suposto pai), não há necessidade de inclusão de X-STRs em testes, mas se o teste envolver pai e filha, os X-STRs podem ser utilizados nos testes, especialmente em casos envolvendo restos mortais exumados, amostras antigas, entre outros (SZIBOR et al., 2007).

Em casos de incesto, estupro e paternidade envolvendo parentes de sangue, os marcadores do cromossomo X também podem ter um maior poder de distinção em comparação aos marcadores autossômicos. Em casos de parentesco onde só é possível realizar teste de parentes distantes, quando há o desejo de reunir famílias separadas pela guerra ou migração e em alguns casos de identificação de restos mortais e corpos de vítimas de guerra e desastres em massa, a utilização de marcadores do cromossomo X pode

apresentar maior eficiência (SZIBOR et al., 2007).

Em análises de misturas de fluidos corporais feminino e masculino, o poder de discriminação dos X-STRs varia em relação ao sexo. Os marcadores do cromossomo X tornam-se mais eficientes que os marcadores autossômicos, quando é realizada a análise de traços femininos na contaminação masculina (estupro). Na investigação de traços em amostras, ambos do sexo feminino, o poder de discriminação dos X-STRs é equivalente aos dos marcadores autossômicos e no caso do sexo masculino os marcadores do cromossomo X é menor do que os marcadores autossômicos (SZIBOR et al., 2007).

2.4 Análise de DNA Mitocondrial

Em 1992, Rebecca Cann & Allan Wilson, lançaram a hipótese da *Eva Mitocondrial*, propondo que todos os seres humanos descendem, ou seja, herdaram DNA mitocondrial (DNAm_t) de uma única mulher de origem africana que viveu há aproximadamente 200.000 anos atrás. Em 1987, estes mesmos autores juntamente com Mark Stoneking haviam publicado na revista *Nature*, o artigo intitulado *Mitochondrial DNA and human evolution*, cujo estudo com pessoas de populações geograficamente distintas, mostrou que, provavelmente, os DNAm_t humanos são de um ancestral proveniente da África (CANN; STONEKING; WILSON, 1987; WILSON; CANN, 1992).

Assim, além do núcleo, as células humanas possuem as organelas mitocôndrias que também portam o seu material genético na forma de DNA circular, de fita dupla e haplóide. No estudo forense, ambos, DNA nuclear e DNAm_t podem ser usados para investigar vestígios ou amostras biológicas (LEITE, 2019; PINTO; CAPUTO; PEREIRA, 2016). De acordo com Reis (2019), quando não há possibilidade de se obter o DNA nuclear, a aplicação do DNAm_t se torna uma opção viável pelo fato do mesmo possuir um alto número de cópias por célula, gerando dados que são passíveis de interpretações em análises de determinadas amostras como vestígios carbonizados, em decomposição, degradados, antigos, fios de cabelo, ossos, sangue e outros fluidos corporais.

Pelo fato do DNAm_t ser de um modelo de herança materna, as sequências obtidas de irmãos e de todos os parentes maternos são iguais, caso não haja mutações, possibilitando traçar a linhagem materna de um indivíduo, o que é de grande relevância em casos de identificação de restos mortais de pessoas desaparecidas (PÉREZ; MONTESINOS, 2004; CICV, 2009). O DNAm_t apresenta uma região codificante e uma região não codificante, denominada região controle, *D-loop* ou região hipervariável (BUDOWLE et al., 2003). O alto grau de polimorfismo evidenciado nas regiões hipervariáveis permite seus estudos na identificação forense, sendo as regiões hipervariáveis I e II (HVI e HVII, respectivamente) geralmente sequenciadas (MORENO; MCCORD, 2008). Atualmente, em decorrência das análises trabalhosas e demoradas do método de sequenciamento de Sanger do DNA, outros métodos têm sido desenvolvidos, como por exemplo, o pirosequenciamento, que consiste em um método robusto, rápido, confiável e de alto poder discriminatório em análises de DNAm_t

(ANDRÉASSON et al., 2002).

Além do seqüenciamento das HVI e HVII, também é investigado os marcadores polimórficos de nucleotídeo simples ou SNPs (do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism*), presentes em todo o DNAmT (JOBILING; GILL, 2004). Desta forma, os SNPs contribuem com um poder de discriminação adicional às análises forenses (MORENO; MCCORD, 2008; JUST et al., 2004).

Outra questão relacionada à análise do DNAmT refere-se a ocorrência de heteroplasmia dada pela presença de duas ou mais seqüências de DNAmT em um indivíduo. A heteroplasmia decorre de polimorfismos de DNA mitocondrial, desta forma ocasionando uma mistura de seqüências de DNAmT mutantes e normais. A heteroplasmia pode ser tanto de seqüência quanto de comprimento. A homoplasmia corresponde à presença de um único tipo de DNA, ou seja, o indivíduo apresenta apenas DNAmT normal (MATSUDA; YUKAWA, 2007).

No contexto forense é de extrema importância levar em consideração a heteroplasmia, uma vez que esta pode dificultar ou pode auxiliar o processo de identificação. Quando as heteroplasmias encontram-se em posições idênticas entre os indivíduos, pode elevar o poder de determinação do perfil analisado. No entanto, geralmente podem ocorrer interpretações equivocadas prejudicando o processo discriminatório o que evidencia a necessidade de preparação dos cientistas forenses para lidarem com análises que envolvam heteroplasmia sendo capazes de interpretá-las (MATSUDA; YUKAWA, 2007).

2.5 SNPs

Os SNPs consistem em polimorfismos de base única resultante na substituição de uma base (A, C, T ou G) por outra. Os SNPs podem ser bi, tri ou treta alélicos, sendo que os dois últimos são extremamente raros em humanos (BROOKES, 1999; BØRSTING; SANCHEZ; MORLING, 2007; SILVA, 2018). Os marcadores SNPs possuem algumas características vantajosas para a identificação forense em relação a outros marcadores, como a possibilidade de serem estudados em regiões-alvo de DNA mais curtas para amplificação, apresentando resultados consideráveis em amostras degradadas importante para testes de paternidade e parentesco, em análises em elevada escala, facilidade de automatização, possibilidade de multiplexação (SILVA, 2018; WALSH, 2007).

Dentre as desvantagens do uso de SNPs está o fato de serem bi-alélicos em sua maioria, o que os tornam menos informativos para testes de identidade em comparação com os marcadores STRs, havendo necessidade de análises de um maior número SNPs (40-60 locos) para ter poder discriminatório equivalente aos dos STRs (13-16 locos) (BUTLER et al., 2007 apud CHAKRABORTY et al., 1999, GILL, 2001 e AMORIM, 2005). O número limitado de alelos dificulta a interpretação quando ocorrem misturas de fluidos corporais, como em casos de estupro, onde duas ou mais amostras de DNA podem estar presentes (BØRSTING; SANCHEZ; MORLING, 2007).

Os SNPs informativos de linhagem encontrados no cromossomo Y e no DNAmT

têm mostrado alto poder informativo decorrente da ausência de recombinação e baixa taxa de mutação. Esses marcadores são utilizados em estudos evolutivos, parentesco e casos forenses relacionados a pessoas desaparecidas e desastres em massa. Os SNPs informativos de ancestralidade estão distribuídos em todo genoma humano e apresentam baixa heteroziguidade. Esses SNPs são adequados para determinar a origem ancestral da amostra de determinado indivíduo e isso pode vir a auxiliar as investigações forenses, uma vez que fornecem indiretamente algumas características fenotípicas do indivíduo (BØRSTING; SANCHEZ; MORLING, 2007; BUDOWLE; DAAL, 2008).

Os SNPs informativos de fenótipo permitem direcionar de forma mais precisa as investigações criminais, uma vez que características fenotípicas específicas podem auxiliar no estabelecimento da identidade de um indivíduo. A maioria dos estudos de SNPs informativos de fenótipo tem sido realizada em genes de pigmentação, sendo aqueles encontrados em alguns desses genes têm sido associados a vários fenótipos da cor de cabelo, olhos, pele (BØRSTING; SANCHEZ; MORLING, 2007; BUDOWLE; DAAL, 2008).

Além do sequenciamento direto de DNA (KWOK; CHEN, 2003), a tipagem de SNPs pode ser realizada por variadas técnicas com capacidade de discriminação alélica. Dentre estas técnicas destacam-se a hibridização alelo específica (ASO, do inglês, *Allele Specific Oligonucleotide Hybridization*) combinada a PCR em Tempo Real por meio da captação do sinal de fluorescente (FRET, do inglês, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) por um *software* específico a partir do uso de sondas marcadas; a hibridização em array (microarray de SNPs) por meio da detecção fluorescente de sondas ASO, em que um grande número de SNPs são analisados (como o array GeneChip® - Affymetrix); o pirosequenciamento por detecção luminométrica do pirofosfato liberado durante a síntese de DNA e o minisequenciamento (SYVÄNEN, 2001; VIGNAL et al., 2002; SOBRINO; BRIÓN; CARRACEDO, 2005).

O minisequenciamento é o método mais utilizado em laboratórios forenses, principalmente, seguido por eletroforese e detecção de fluorescência (SNaPshot - Applied Biosystems). Uma vez que não é necessário o investimento em equipamentos específicos, pois a detecção é realizada com equipamento de eletroforese capilar, a capacidade do multiplex corresponde às necessidades forenses, e consiste em um método rápido, robusto e preciso (SANCHEZ et al., 2003; BRION et al., 2004; GRIGNANI et al., 2006; SANCHEZ et al., 2006).

No entanto, o minisequenciamento seguido de detecção direta por MALDI-TOF MS (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) e microarrays também podem apresentar vantagens em análises forenses (SOBRINO; BRIÓN; CARRACEDO, 2005). As vantagens MALDI-TOF MS, principalmente quando envolve grandes conjuntos de amostras, consistem na sua precisão, confiabilidade, sensibilidade, especificidade, rapidez e baixo custo. No entanto, apresenta limitações para investigações forenses devido ao elevado custo de equipamentos específicos, dificuldade em analisar SNPs em amostra contendo DNA de mais de um indivíduo, menor sensibilidade do multiplex,

necessidade de rigorosos procedimentos de purificação em amostras de DNA (MENGEL-JORGENSEN et al., 2004; KEYSER; PETKOVSKI, 2006).

O pirosequenciamento pode ter vantagens como a capacidade de analisar amostras de DNA de baixa qualidade e quantidade diminuta, sensibilidade, rapidez, simplicidade, precisão, capacidade de quantificação de cada alelo em amostras contendo misturas de DNA de diferentes indivíduos. As desvantagens deste método são a capacidade de multiplexação reduzida e a automação trabalhosa em decorrência da execução de várias etapas antecedentes a detecção (ANDRÉASSON et al., 2002; SOBRINO; BRIÓN; CARRACEDO, 2005; HARRISON et al., 2006; ANDRÉASSON et al., 2006).

3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, percebe-se que a genética molecular trouxe e traz contribuições de suma importância para as investigações que necessitam das discriminações individuais, que se deve sobretudo pela evolução do conhecimento científico e o desenvolvimento de novas plataformas para a identificação e análise de marcadores moleculares, as quais aumentam o poder de genotipagem na identificação de indivíduos. As análises genéticas do DNA tornaram-se ferramentas poderosas e essenciais na esfera judicial, tanto nos casos referentes à investigação de vínculo genético, quanto em casos de identificação individual. As técnicas que permitem o estudo de marcadores moleculares, principalmente do tipo STRs tem se tornado rotina nos laboratórios mundiais por serem primordiais para realização da identificação empregando pequena quantidade de material biológico, o que é freqüentemente comum nas análises forenses. Desta forma, é de suma importância a presença da genética molecular forense em instituições periciais brasileiras, a fim de promover um aumento da eficiência de distinção entre os indivíduos investigados na resolução de casos forenses.

REFERÊNCIAS

ANDRÉASSON, H. et al. Quantification of mtDNA mixtures in forensic evidence material using pyrosequencing. **Int. J. Legal Med.**, v. 120, n. 6, p. 383-390, 2006.

ANDRÉASSON, H. et al. Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. **BioTechniques**, v. 32, n. 1, p. 124-133, 2002.

BIRUS, I. et al. How high should paternity index be for reliable identification of war victims by DNA typing? **Croat. Med. J.**, v. 44, n. 3, p. 322-326, 2003.

BØRSTING, C.; SANCHEZ, J. J.; MORLING, N. Application of SNPs in Forensic Casework. In: Rapley, R. & Whitehouse, D. (Ed.). **Molecular forensics**. 1. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. p. 91-102.

BRASIL. Projeto Lei n. 417, de 19 de março de 2003. Altera o art. 1º da Lei nº 10.054, de 7 de dezembro de 2000, inserindo o DNA para a identificação criminal. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/sileg/integras/118464.pdf>>. Acesso em: 27 de junho de 2021.

BRETTELL TA, BUTLER JM, SAFERSTEIN R. Forensic science. **Anal Chem.** 2005 Jun 15;77(12):3839-60. doi: 10.1021/ac050682e. PMID: 15952759.

BRION, M. et al. Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. **Int. J. Legal Med.**, v. 119, n. 1, p. 10-15, 2004.

BROOKES, A. J. - The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

BROWN, T. A. Southern Blotting and Related DNA Detection Techniques. **Encyclopedia Of Life Sciences (eLS)**, 2001, 4p. Disponível em: <[http://web.udl.es/usuarios/e4650869/docencia/segoncicle/genclin98/recursos_classe_\(pdf\)/revisionsPDF/SouthernBlot-.pdf](http://web.udl.es/usuarios/e4650869/docencia/segoncicle/genclin98/recursos_classe_(pdf)/revisionsPDF/SouthernBlot-.pdf)>. Acesso em: 26 junho 2021.

BUDOWLE, B.; DAAL A. V. Forensically relevant SNP classes. **BioTechniques**, v. 44, n. 5 p. 603-610, 2008.

BUDOWLE, B. et al. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 4, 119-141, 2003.

BUTLER, J. M.; COBLE, M. D. & VALLONE, P. M. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. **Forensic Sci. Med. Pathol.**, v. 3, p. 200-205, 2007.

BUTLER, J. M. et al. Chromosomal duplications along the y-chromosome and their potential impact on Y-STR interpretation. **J. Forensic Sci.**, v. 50, n. 4, p. 853-859, 2005.

BUTLER, J. M. et al. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 10-11, p. 1397-1412, 2004.

CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, v. 325, n. 6099, p. 31-36, 1987.

CHIURILLO, M. A. et al. Genetic profiling of a central Venezuelan population using 15 STR markers that may be of forensic importance. **Forensic Sci. Int.**, v. 136, n. 1-3, p. 99-101, 2003.

COMITÉ INTERNACIONAL DA CRUZ VERMELHA (CICV). **Pessoas desaparecidas, análise de DNA e identificação de restos mortais**: um guia para as melhores práticas em conflitos armados e outras situações de violência armada. 2. ed. Genebra: CICV, 2009. 49 p.

DALE, W. M.; GREENSPAN, O.; OROKOS, D. **DNA Forensics**: Expanding Uses and Information. California: SEARCH, 2006. 18 p.

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION (FBI). Crime Scene Search. In: Waggoner, K. (Ed.). **Handbook of Forensic Services**. Quantico: Pentagon Publishing, 2011. p. 94-184.

GARRIDO, R. G. Evolução dos processos de identificação humana: das características antropométricas ao DNA. **Genét. Esc.**, v. 05, v. 2, p. 38-40, 2009.

GILL, P., JEFFREYS, A. & WERRETT, D. **Forensic application of DNA 'fingerprints'**. *Nature* **318**, 577–579, 1985.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução a Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 744 p.

GRIGNANI, P. et al. Subtyping mtDNA haplogroup H by SNaPshot minisequencing and its application in forensic individual identification. *Int. J. Legal Med.*, v. 119, n. 1, p. 10-15, 2006.

HARRISON, C. et al. A sensitive issue: pyrosequencing as a valuable forensic SNP typing platform. *Int. Congress Ser.*, v. 1288, p. 52-54, 2006.

IZAGIRRE, N. et al. Estimación del sexo a nivel molecular en restos esqueléticos humanos. *MUNIBE (Antrop.-Arkeol.)*, n. 53, p. 143-150, 2001.

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

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. **Individual-specific 'fingerprints' of human DNA**. *Nature* **316**, 76–79, 1985.

JOBIM, M. R. et al. Novos testes de DNA na investigação de paternidade com suposto pai falecido. *RT/Fasc. Civ.*, v. 874, p. 55-69, 2008.

JOBLING, M. A.; GILL, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat. Rev.-Genet.*, v. 5, n. 10, p. 739-752, 2004.

JUST, R. S. et al. Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. *Forensic Sci. Int.*, v. 146, p. 147-149, 2004.

KASHYAP, V. K. et al. DNA profiling technologies in forensic analysis. *Int. J. Hum. Genet.*, v. 4, n. 1, p. 11-30, 2004.

KAYSER, M. Y-Chromosomal markers in forensic genetics. In: Rapley, R. & Whitehouse, D. (Ed.). **Molecular forensics**. 1. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. p. 141-161.

KWOK, P.-Y.; CHEN, X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.*, v. 5, n. 2, p. 43-60, 2003.

LEITE, Viviane da Silva; et.al. Uso das técnicas de biologia molecular na genética forense. **Derecho y Cambio Social** – 2013. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5475842>.

MATSUDA, H.; YUKAWA, N. Mitochondrial Analysis in Forensic Science. In: RAPLEY, R. & WHITEHOUSE, D. (Ed.). **Molecular forensics**. 1. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. p. 127-140.

MELLO, F. C. de Q.; FONSECA-COSTA, J. A utilidade da biologia molecular no diagnóstico da tuberculose. *J. Bras. Pneumol.*, v. 31, n. 3, p. 188-190, 2005.

MENGEL-JORGENSEN, J. et al. Multiplex Y chromosome SNP genotyping using MALDI-TOF mass spectrometry. **Int. Congress Ser.**, v. 1261, p. 15-17, 2004.

Miozzo, M. Biología Forense: Genética Forense. **Opera lilloana** 54, Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina 2019.

MORENO, L. I.; MCCORD, B. Separation of DNA for Forensic Applications Using Capillary Electrophoresis. In: Landers, J. P. (Ed.). **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 733-756.

NEVES, A. F. **Ensino de biologia**. Organizadora: Adriana Freitas Neves. Goiânia: Gráfica da UFG, 2017. Ebook, 135 p. il, figs. Design gráfico e projeto editorial feito pelo Centro de Integrado de aprendizagem em rede (CIAR). ISBN: 978-85-495-0153-0. Capítulo 2. Parte 2 do modulo 2. Disponível em: <<https://producao.ciar.ufg.br/ebooks/ensino-de-biologia/index.html>>

NAIAZI, G. A. Genetics and biotechnology in historical perspective: a review. **World J. Med. Sci.**, v. 2, n. 2, p. 65-77, 2007.

OLIVEIRA, M. C. DE S. et al. Fundamentos teórico-prático e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia de polimerase. São Carlos: **EMBRAPA** Pecuária Sudeste, 2007. Disponível em: <<http://www2.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacao gratuita/e-book/LivroProt-Molecular.pdf>>. Acesso em: 18 junho 2021.

PARSONS, T. J. et al. Application of novel “mini-amplicon” STR multiplexes to high volume casework on degraded skeletal remains. **Forensic Sci. Int. Genet.**, v.1, n. 2, p. 175-179, 2007.

PASTINEN, T. et al. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. **Genome Res.**, v, 7, n. 6 p. 606-614, 1997.

PENA, S. D. J.; CARVALHO-SILVA, D. R.; SANTOS, F. R. Utilização de polimorfismos de DNA do cromossomo Y no estudo do povoamento das Américas. **R. USP**, v. 34, p. 44-57, 1997.

PENA, S. D. J.; PRADO, V. E.; EPPLEN, J. T. DNA diagnosis of human genetic individuality. **J. Mol. Med.**, v. 73, p. 555-564, 1995.

PÉREZ, J. G.; MONTESINOS, A. M. B. Medicolegal work in major disasters. In: PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO) (Ed.). **Management of Dead Bodies in Disaster Situations**. Washington, DC: PAHO, 2004. p. 13-70. (Disaster Manuals and Guidelines on Disasters Series, n. 5).

PINTO, L.; CAPUTO, I.; PEREIRA, M. Importância do DNA em Investigações Forenses: Análise de DNA Mitocondrial. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics, [S. l.]**, v. 6, n. 1, p. 84–107, 2016. DOI: 10.17063/bjfs6(1)y201684. Disponível em: <https://www.ipebj.com.br/bjfs/index.php/bjfs/article/view/612>. Acesso em: 1 jul. 2021.

RAPLEY, R.; WHITEHOUSE, D. Basic Tools and Techniques in Molecular Biology. In: Rapley, R. & Whitehouse, D. (Ed.). **Molecular forensics**. 1. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. p. 21-35.

REIS, R.S. DNA mitocondrial como ferramenta na investigação da ancestralidade materna e da estrutura populacional no Espírito Santo. 2019. 83f. **Tese** (Doutorado em Biotecnologia) - **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES**, Espírito Santo. Brasil.

ROGAEV, E. I. et al. Genomic identification in the historical case of the Nicholas II royal family. **PNAS**, v. 106, n. 13, p. 5258–5263, 2009.

ROSS, M. T. et al. The DNA sequence of the human X chromosome. **Nature**, v. 4, n. 7031, p. 325-337, 2005.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SANCHEZ, J. J. et al. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. **Electrophoresis**, v. 27, n. 9, p. 1713-1724, 2006.

SANCHEZ, J. J. et al. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs--a model with 35 Y chromosome SNPs. **Forensic Sci. Int.**, v. 137, n. 1, p. 74-84, 2003.

SASAKI, S.; SHIMOKAWA, H. The amelogenin gene. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 39, n. 1, p. 127-133, 1995.

SHEWALE, J. G. et al. DNA profiling of azoospermic semen samples from vasectomized males by using Y-PLEX™6 amplification kit. **J. Forensic Sci.**, v. 48, n. 1, p. 1-3, 2003.

SILVA, Guilherme do Valle. **Análise de marcadores forenses (STRs e SNPs) rotineiramente empregados na identificação humana utilizando sequenciamento de nova geração**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. doi:10.11606/D.59.2019.tde-23112018-095204.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 922 p.

SOBRINO, B. et al. SNP genotyping with single base extension-tag microarrays, **Int. Congress Ser.**, v. 1261, p. 331-333, 2004.

SOBRINO, B.; BRIÓN, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Sci. Int.**, v. 154, n. 2-3, p. 181-94, 2005.

SYVÄNEN, A. C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, n. 12, p. 930-942, 2001.

SZIBOR, R. The X chromosome in forensic science: past, present and future. In: RAPLEY, R. & WHITEHOUSE, D. (Ed.). **Molecular forensics**. 1. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. p. 103-126.

SZIBOR, R. et al. Use of X-linked markers for forensic purposes. **Int. J. Leg. Med.**, v. 117, n. 2, p. 67-74, 2003.

TAHERI, M. S. et al. Large Splenic Mass of Extramedullary Hematopoiesis. **Iran. J. Radiol.**, v. 2, n. 3,4, p. 99-101, 2005.

TAMAKI, K. Minisatellite and Microsatellite DNA Typing Analysis. In: RAPLEY, R. & WHITEHOUSE, D. (Ed.). **Molecular forensics**. 1. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. p. 71-89.

VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet. Sel. Evol.**, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

von WURMB-SCHWARK, N.; BOSINSKI, H.; RITZ-TIMME, S. What do the X and Y chromosomes tell us about sex and gender in forensic case analysis? **J. Forensic Leg. Med.**, v. 14, n. 1, p. 27-30, 2007.

WALSH, S. J. Current and Future Trends in Forensic Molecular Biology. In: Rapley, R. & Whitehouse D. (Ed.). **Molecular forensics**. 1. ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007. p. 1-19.

WILSON, A. C.; CANN, R. L. The recent African genesis of humans. **Sci. Am.**, v. 266, n. 4, p. 68-73, 1992.

CAPÍTULO 3

ASPECTOS GENÉTICOS DA FIBROSE CÍSTICA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Data de aceite: 01/10/2021

Data de submissão: 06/09/2021

Amanda Holanda Cardoso Maciel

Universidade Estadual do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/7323302371424773>

Vitor Araújo Marinho

Centro Universitário Unichristus
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/1103480575210739>

Lídia Vieira do Espírito Santo

Universidade Estadual do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/9583521302146988>

Guilherme Pinho Mororó

Universidade Federal do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/9400717527663784>

Marla Rochana Braga Monteiro

Universidade Estadual do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/1247331476743501>

Morgana Cléria Braga Monteiro

Universidade Federal do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/4818460619610387>

Lucas Lessa de Sousa

Universidade Estadual do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/5804855001137896>

Raquel Matoso Freire

Universidade Estadual do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/5420382497855390>

Lucas Oliveira Sibellino

Universidade Estadual do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/4091270693762152>

Ticiano Freire Bezerra

Centro Universitário Unichristus
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/3361200188637664>

Maria Denise Fernandes Carvalho

Universidade Estadual do Ceará
Fortaleza - Ceará
<http://lattes.cnpq.br/1093806094902957>

RESUMO: Introdução: A Fibrose Cística (FC) é a doença genética mais comum na população caucasiana, com prevalência de 1/3000 e mais de 2000 mutações documentadas. De herança monogênica e autossômica recessiva, a FC é decorrente de uma mutação no regulador transmembrana, CFTR, que age como canal iônico e está presente no tecido epitelial dos mais diversos órgãos. Sua disfunção acarreta produção de secreções espessas que tendem a obstruir os ductos dos órgãos afetados. O objetivo do trabalho é revisar a literatura a respeito dos aspectos genéticos da FC. **Metodologia:** Foi conduzida uma busca nos bancos de dados científicos eletrônicos LILACS, MEDLINE e Web of Science. Os descritores utilizados foram: “cystic fibrosis”, “genetic heterogeneity”, “CFTR

protein” e “molecular targeted therapy”. Foram utilizados 34 artigos nesta revisão, os quais foram analisados e sintetizados de forma reflexiva, a fim de obter informações consistentes e relevantes para a revisão. **Resultados:** A FC, apesar de ser monogênica, conta com uma herança genética complexa. O grande número de mutações a causam, assim como a quantidade de genes modificadores que interagem com as disfunções do CFTR, fazem da FC um grande desafio clínico. A FC tem sido alvo de inúmeras pesquisas para terapias alvo e genéticas que tem melhorado a sobrevida dos pacientes, causando aumento da expectativa de vida. **Conclusão:** O avanço da biotecnologia traz perspectivas promissoras para o tratamento da FC. Para o futuro, os grandes desafios são o desenvolvimento de terapias alvo e de terapias genéticas capazes de reduzir a morbimortalidade e mudar a história natural da doença.

PALAVRAS-CHAVE: Fibrose cística, Proteína CFTR, Genética, Terapia alvo, Terapia genética

GENETIC ASPECTS OF CYSTIC FIBROSIS: A LITERATURE REVIEW

ABSTRACT: Introduction: Cystic Fibrosis (CF) is the most common genetic disease in the Caucasian population, with a prevalence of 1/3000 and more than 2000 documented mutations. With monogenic and autosomal recessive inheritance, CF results from a mutation in a transmembrane regulator, CFTR, which acts as an ion channel and is present in the epithelial tissue of the most diverse organs. Its dysfunction leads to the production of thick secretions that tend to obstruct the ducts of the affected organs. The objective is to review the literature regarding the genetic aspects of CF. **Methodology:** A search was conducted in the electronic scientific databases LILACS, MEDLINE and Web of Science. The descriptors used were: “cystic fibrosis”, “genetic heterogeneity”, “CFTR protein” and “molecular targeted therapy”. Thirty-four articles were used in this review, which were analyzed and synthesized in a reflective way, in order to obtain consistent and relevant information for this article. **Results:** CF, despite being monogenic, has a complex genetic inheritance. The large number of mutations that cause the disease, as well as the amount of modifying genes that interact with CFTR dysfunctions, make CF a great clinical challenge. CF has been the target of numerous researches for targeted and genetic therapies that have improved survival, causing an increase in life expectancy. **Conclusion:** The advance of biotechnology brings promising prospects for the treatment of CF. For the future, the great challenges are the development of targeted therapies and gene therapies capable of reducing morbidity and mortality and changing the natural history of the disease.

KEYWORDS: Cystic Fibrosis, CFTR Protein, Genetics, Targeted therapy, Gene therapy.

1 | INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) é a doença genética autossômica recessiva mais frequente na população caucasiana, com uma prevalência média de 1:3000 na Europa, América do Norte e Oceania (CFF, 2020). No Brasil, por sua vez, a prevalência é em torno de 1:7000 (RASKIN, 2001). A doença tem característica recessiva e monogênica e afeta o canal regulador de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR), que atua no controle de eletrólitos

de células epiteliais e, portanto, no balanço osmótico de secreções. Devido à expressão multissistêmica desse canal, diferentes órgãos são afetados em graus variáveis, o que leva à diversidade de manifestações fenotípicas da FC (ELBORN, 2016). Pacientes com FC apresentam secreções viscosas e espessas no trato biliar, pâncreas, intestino, sistema reprodutor e, notadamente, no sistema respiratório. A história natural da doença evolui com infecções crônicas e recorrentes do trato respiratório, além de presença de flora bacteriana específica e alterações funcionais e estruturais pulmonares que culminam em insuficiência respiratória (DRUMM, 2013). Com o avanço da medicina e do diagnóstico precoce através da triagem neonatal, os pacientes com FC têm elevado sua expectativa de vida, podendo atingir até a quinta década de vida (KEOGH, 2018).

Até o momento mais de 2000 variantes do gene CFTR são conhecidas, o que possibilita um amplo espectro de gravidade e de manifestações clínicas. A mutação mais prevalente, a F508del (deleção do resíduo de fenilalanina na posição 508), é a variante com melhor correlação genótipo-fenótipo para as manifestações clínicas da FC e é o alvo principal das terapêuticas em estudo atualmente. Devido ao caráter monogênico da doença e à razoável prevalência da condição na população caucasiana, a FC tornou-se um modelo de estudo para terapias alvo moleculares e terapias genéticas. O conhecimento a respeito dos aspectos genético-moleculares da doença, portanto, torna-se essencial no contexto de avanço das técnicas de biotecnologia (FAJAC, 2017).

2 | OBJETIVO

O objetivo deste artigo é discutir, por meio de uma revisão narrativa, os aspectos genéticos da FC, bem como sua influência nas novas modalidades terapêuticas disponíveis.

3 | METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma pesquisa bibliográfica do tipo descritiva, caracterizando-se como uma revisão narrativa. Para a elaboração desta revisão foi conduzida uma busca nas bases de dados científicos eletrônicos LILACS, MEDLINE e Web of Science via Portal BVS, PubMed e Portal CAPES, respectivamente. Aplicaram-se os seguintes descritores presentes no DeCS e MESH, assim como suas combinações na língua inglesa e portuguesa: “cystic fibrosis”, “genetic heterogeneity”, “CFTR protein” e “molecular targeted therapy”. Foram introduzidas também fontes localizadas por busca externa de sites oficiais, como o Cystic Fibrosis Foundation (CFF). O conteúdo utilizado para a construção da revisão foi examinado a partir de publicações compreendidas no período entre 2015 e 2021.

Os critérios de inclusão estabelecidos foram: a) artigos publicados em inglês ou português e b) abordagem dos aspectos genéticos da FC. Já os critérios de exclusão utilizados foram a) fuga ao tema central da pesquisa, b) ausência de abstract disponível para

leitura e c) ausência de atualizações relevantes sobre o tema. Foram selecionados 34 artigos para a produção desta revisão, tendo sido analisados e sintetizados de forma reflexiva.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Canal Regulador De Condutância Transmembranar da Fibrose Cística (CFTR)

Identificado e clonado em 1989 por Riordan e colaboradores, o gene responsável pela proteína CFRT contém 27 éxons distribuídos em aproximadamente 189 kb de DNA no braço longo do cromossomo 7 (locus 7q31). Quando transcrito, o RNA maduro origina uma proteína com 1.480 aminoácidos em sua composição. O canal CFTR é membro da superfamília de transportadores com cassetes de ligação a ATP (ABC). O canal conta com dois domínios integrais de membrana, que formam o poro do canal, e dois domínios de ligação a nucleotídeo (NBD1 E NBD2), que se ligam ao ATP. A principal mutação responsável pela FC, a F508del, ocorre no domínio NBD1 (ARONSON, 2015).

O CFTR é localizado na superfície apical de células epiteliais e atua no controle de eletrólitos destas células e, portanto, no balanço osmótico de secreções exócrinas. É responsável por conduzir cloreto e bicarbonato na membrana apical de diferentes epitélios, regulando o transporte de água e íons e mantendo a hidratação da superfície epitelial (FARREL, 2020). Quando o CFTR apresenta algum defeito, ocorrem alterações no transporte de cloreto e bicarbonato para a superfície apical do epitélio, o que pode desregular a osmolaridade das secreções. Como consequência, ocorrem obstruções ductais devido à formação de secreções desidratadas e espessas, levando a danos teciduais. Além disso, o CFTR também tem papel de absorção nas glândulas sudoríparas, o que faz com que sua disfunção cause o típico suor salgado do fibrocístico (ELBORN, 2016).

4.2 Características Genéticas

A FC é uma doença genética monogênica de herança autossômica recessiva. É causada pela presença de mutações em ambas as cópias do gene que codifica o canal CFTR. Ela ocorre tanto pela presença de uma mesma mutação nos dois alelos como por mutações diferentes em cada um deles, caracterizando um heterozigoto composto. Essa variedade genética deve-se à grande diversidade de mutações que podem desencadear a doença, sendo registradas, até o momento, mais de 2000 variantes do gene para o CFTR (CFF, 2020). Essa grande quantidade de mutações tem levado a crer que a maior parte da população caucasiana carrega alguma mutação para a codificação do canal (QUON, 2016).

Apesar do grande número de mutações, a F508del é a variante mais prevalente, estando presente em 82,4% dos pacientes europeus (CUTTING, 2015). É também a mutação que melhor correlaciona-se fenotipicamente com as manifestações clínicas típicas da FC, como sintomas respiratórios e insuficiência pancreática (BAREIL, 2020).

As diferentes mutações têm frequências variáveis entre grupos étnicos distintos. Na Grã-Bretanha, por exemplo, a F508del tem uma prevalência de 81%, enquanto na Turquia, apenas de 24,5%. Além disso, outras variantes são prevalentes em grupos étnicos particulares, como a c.273+1G>A nas populações eslavas e a 405+1G>A entre os judeus (BAREIL, 2020; CFF, 2020). O conhecimento a respeito da prevalência local de variantes é uma ferramenta de auxílio para triagem e diagnóstico precoces da FC em determinadas populações e pode guiar a investigação genética de forma mais precisa e acurada.

No Brasil, essa diversidade de variantes é acentuada graças à miscigenação da população, o que traz como consequência uma variação alélica significativa com interessantes diferenças regionais entre os estados (DE SOUZA, 2017). Por exemplo, na Bahia, estado notadamente afro-descendente, a prevalência de F508del é de 8,7%, estando abaixo dos dados mundiais, principalmente quando comparamos com países de população caucasiana. Já para a G542X, a segunda mutação mais frequente no Brasil, a diversidade regional varia de uma prevalência de 8,3% em São Paulo até 0% no Maranhão (MOTA, 2015).

Um estudo publicado em 2018 por Rosa e colaboradores elencou as principais mutações encontradas em crianças e adolescentes fibrocísticos no sul do Brasil, elencando a correlação genótipo-fenótipo encontrada. A F508del esteve presente em cerca de 90% dos pacientes, correlacionando-se a fenótipos de insuficiência pancreática, redução da função pulmonar e aumento do cloro no suor. Além disso, outras variantes encontradas em maior prevalência foram G542X, N1303K e R1162X (ROSA, 2018). No quadro 1 estão elencadas as principais mutações encontradas, além de sua frequência e seu fenótipo correlato.

MUTAÇÃO	FREQUÊNCIA DE ALELOS	FENÓTIPO
F508del	71,43%	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiência pancreática • Cloro no suor elevado • Redução da função pulmonar
G542X	7,14%	<ul style="list-style-type: none"> • Íleo Meconial • Insuficiência pancreática
R1162X	4,76%	<ul style="list-style-type: none"> • Cloro no suor elevado • Redução na função pulmonar leve • Insuficiência pancreática
N1303K	4,76%	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiência pancreática grave • Diabetes Mellitus
711+5G>A	1,1%	<ul style="list-style-type: none"> • Pancreatite • Hepatopatias • Colonização <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>

Quadro 1 - Variantes do CFTR frequentes no Brasil e sua relação genótipo-fenótipo.

FONTE: Rosa, 2018

4.3 Fisiopatologia

CLASSE	MECANISMO	MUTAÇÕES
I	Mutações de produção: Ausência completa da proteína CFTR devido à terminação prematura do mRNA	G542X W1282X R553X 621 + G> T 1717-1G> A
II	Mutações de processamento: Modificações pós-traducionais anormais que impedem a proteína de trafegar para a localização celular correta	F508del N1303K A455E
III	Mutações de passagem: Anormalidades nas regiões de dobra de ligação nuclear levando à diminuição da atividade da proteína como canal de cloreto	G551D S549N
IV	Mutações de condução: Redução da frequência do fluxo de íons e da duração da abertura do canal.	D1152H R347P R117H
V	Redução do CFTR funcional: Mutações que alteram a estabilidade do mRNA, levando a quantidades insuficientes de CFTR maduro na membrana.	A455E
VI	Aumento do turnover: Rotatividade aumentada devido a anormalidades do terminal C.	Q1412X

Quadro 2 - Classe de mutações do CFTR.

FONTE: Welsh, 1993 e Rafeeq, 2017.

Em 1993 Welsh e Smith propuseram uma classificação das mutações do CFTR baseada nos mecanismos patogênicos, nos efeitos das mutações nas proteínas e na quantidade de produto expresso.

As mutações da classe I caracterizam-se por defeitos genéticos que causam ausência completa da proteína CFTR devido à instabilidade molecular causada por terminação prematura do RNA mensageiro. Já as mutações classe II são decorrentes de defeitos de processamento ou transporte do CFTR, levando à redução da expressão apical do canal. As mutações classe III dizem respeito a anormalidades de regulação do canal levando à redução da sua atividade ou defeitos de passagem. Mutações classe IV geram alteração de condutância do fluxo iônico, especialmente do íon cloreto. Já a classe V representa redução da transcrição do CFTR, com menor produção de canais funcionais. A classe VI, por sua vez, caracteriza-se pela presença de mutações que aumentam a degradação do CFTR presente na membrana apical (WELSH, 1993; RAFEEQ, 2017).

A variante mais prevalente, F508del, apresenta-se como classe II, pois produz defeito na maturação e no processamento do canal CFTR, levando à redução de CFTR funcional na superfície das células epiteliais. Além disso, os canais que conseguem alcançar a membrana apical também apresentam defeito de passagem - defeito da classe III e IV (ELBORN, 2016).

Apesar de didática, esta classificação não engloba o processo fisiopatológico de todas as variantes conhecidas. Algumas mutações inclusive interferem em mais de um mecanismo

molecular classificado, como a própria F508del. Além disso, as funções relacionadas ao transporte de bicarbonato e à regulação do pH não são englobadas por esta classificação, mesmo podendo ter algum impacto na manifestação clínica multissistêmica (BAREIL, 2020).

4.4 Correlação Genótipo-fenótipo

Considerando a classificação das variantes pelos mecanismos fisiopatológicos, a presença de duas variantes das classes I, II ou III estão associadas a um fenótipo mais grave, geralmente evoluindo com insuficiência pancreática. Já a presença concomitante de mutações das classes IV, V ou VI associam-se a fenótipos mais brandos devido à presença de função residual do CFTR (RAFEEQ, 2017).

Os dados de diversos estudos levam a crer que os indivíduos homocigotos para F508del costumam apresentar sintomatologia pulmonar precoce e função pulmonar reduzida, além de pronunciada insuficiência pancreática (ROSA, 2018 e CORREIA, 2015). Dentre as mutações frequentes na população brasileira, as mais prevalentes apresentam correlação genótipo-fenótipo bem estabelecida para doença pulmonar e pancreática, como observado no quadro 1.

Uma metanálise recente analisou a associação de algumas variantes do CFTR com a manifestação clínica de infertilidade masculina e observou maior prevalência da mutação IVS5-5T em pacientes com infertilidade ou azoospermia não obstrutiva (YANG, 2020). Esse dado pode tanto orientar o aconselhamento pré-concepcional de pacientes fibrocísticos como auxiliar no diagnóstico de casos de infertilidade masculina de causa não obstrutiva sem história conhecida de FC.

Apesar de algumas variantes apresentarem correlação genótipo-fenótipo bem conhecida, isso não se aplica a todas as mutações ou manifestações clínicas. Em certas populações há disparidade entre o genótipo estudado e o fenótipo apresentado. Observa-se que entidades multifatoriais interferem no fenótipo final das manifestações clínicas, especialmente no quadro pulmonar. Condições socioeconômicas, aderência a tratamentos, nível de desenvolvimento local e genes modificadores podem interferir no fenótipo clínico da FC (STEPHERSON, 2017).

4.5 Genes Modificadores

Ao expressarem-se em um mesmo ambiente celular ou tecidual, os genes tendem a interagirem e influenciarem uns aos outros, modificando sua forma de expressão e seus produtos. Essas interações nos levam a crer que o padrão de herança ligado ao fenótipo é mais complexo do que se imaginava para doenças monogênicas como a FC (CORVOL, 2015).

Apesar das manifestações pancreáticas apresentarem uma correlação genótipo-fenótipo mais estabelecida, isto não se aplica às doenças pulmonares e hepáticas ligadas à FC (TROUVÈ, 2017). A presença de genes modificadores parece causar grande impacto

na gravidade da manifestação clínica final, apontando a importância do conhecimento a seu respeito.

Observa-se melhor correlação genótipo-fenótipo para as manifestações respiratórias quando são observadas mutações em genes modificadores. Um exemplo é o fator transformador de crescimento beta 1 (TGF-beta 1). O TGF-beta 1 suprime a atividade de linfócitos T e, conseqüentemente, a produção de citocinas. Estudos recentes têm observado que a presença de polimorfismos no gene TGF-beta 1 estão associados ao aumento da gravidade das manifestações pulmonares (KRAMER, 2018).

Além disso, têm-se estudado o gene MBL (lecitina ligante de manose) devido à sua relação com infecções na FC. Como componente do sistema complemento, o MBL tem função na proteção inata contra infecções. Variantes do gene MBL que causem redução dos seus níveis séricos podem levar ao aumento da susceptibilidade a infecções, especialmente por *Pseudomonas aeruginosa*, o que causa grande impacto na morbimortalidade dos pacientes fibrocísticos (NOURKAMI-TUTDIBI, 2021).

No quadro 3 estão ilustrados alguns genes ou *loci* que são apontados como genes modificadores na FC, influenciando manifestações clínicas específicas.

MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	GENE/LOCI
Doença obstrutiva pulmonar	TGFβ1, MBL2, EHF, APIP, SLC9A3, SLC6A14, cromossomo 20q13.2, cromossomo 11p12-p13
Obstrução intestinal	MSRA, SLC6A14, SLC9A3
Infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MBL2, DCTN4, SLC6A14
Diabetes	TCF7L2, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, SLC26A9

Quadro 3 - Genes modificadores e manifestações clínicas associadas.

FONTE: Egan, 2020 e Corvol, 2015.

4.6 Terapias Alvo e Terapias Genéticas

Historicamente, o tratamento da FC consistia em lidar com as consequências dos acometimentos orgânicos específicos, como, por exemplo, das infecções pulmonares ou da insuficiência pancreática. Entretanto, com o avanço da biotecnologia e com a identificação de novas mutações no gene CFTR, a utilização de terapias genéticas e de terapias alvo tem emergido (FAJAC, 2017).

As terapias alvo têm como principal objetivo corrigir anormalidades estruturais e funcionais do CFTR. Para tanto, a identificação do defeito do condutor é essencial. Essas terapias podem agir sobre o CFTR potencializando-o, modulando-o, corrigindo-o ou modificando sua tradução (QUON, 2016).

O primeiro modulador do CFTR aprovado para tratamento da FC foi o Ivacaftor. A

droga classifica-se como potencializadora, ou seja, sua ação baseia-se na estabilização do estado patente do CFTR, aumentando seu tempo de abertura. É indicado, portanto, para pacientes com defeitos de abertura do canal, como os provocados pelas mutações da classe III - que tem quantidades normais de CFTR, porém com redução do fluxo iônico (BARRY, 2021). Os ensaios com Ivacaftor demonstraram melhoria notável da função pulmonar e do estado nutricional, além de confirmarem no teste do suor a restauração da função normal do CFTR, com a medida de cloreto abaixo de 60 mEq/L (ROSENFELD, 2019). Os estudos dessa droga, entretanto, devem ser continuados a fim de verificar seus efeitos a longo prazo. Alguns dos efeitos colaterais relatados incluem catarata e aumento das transaminases hepáticas, o que alerta para a necessidade de acompanhamento constante dos pacientes que fazem uso da droga (FAJAC, 2017).

Como cerca de 80% dos fibrocísticos apresentam a F508del em algum alelo do CFTR, o desenvolvimento de uma droga para correção das mutações classe II tem um grande impacto no tratamento da FC. Nesse cenário, o Lumacaftor, um corretor do CFTR, tem sido bastante estudado. Sua ação baseia-se na facilitação da maturação e do transporte correto do CFTR, por estabilizar conformacionalmente o produto mutado e permitir sua condução à superfície celular. Estudos *in vitro* com células epiteliais brônquicas humanas comprovaram melhoria na maturação do CFTR e no transporte de cloreto. Em associação com Ivacaftor, o Lumacaftor demonstrou melhora significativa da função pulmonar e do estado nutricional, com diminuição do número de episódios de exacerbações pulmonares (WAINWRIGHT, 2015).

Estudos recentes também têm investigado o impacto da terapêutica combinada de corretores e potencializadores no tratamento de pacientes homocigotos para F508del. Um estudo analisou o impacto funcional do uso de Ivacaftor, Tezacaftor e Elexacaftor concomitantemente - o primeiro sendo potencializador e os dois últimos, corretores. O estudo demonstrou melhoria expressiva na função pulmonar, concentração de cloreto no suor, qualidade de vida relacionada à respiração e parâmetros nutricionais. Os dados foram comparados com pacientes que faziam uso de terapia dupla com Tezacaftor e Ivacaftor. Quanto aos efeitos colaterais, a terapêutica foi bem tolerada, apresentando bom perfil de segurança (HEIJERMAN, 2019).

No quadro 4 encontra-se as principais medicações moduladoras do CFTR de acordo com sua fase do estudo clínico. Algumas já estão disponíveis no mercado, fazendo parte do arsenal terapêutico de fibrocísticos com mutações específicas.

Apesar dos moduladores do CFTR representarem um grande avanço para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com FC, as medicações disponíveis ainda são restritas a mutações específicas, limitando o público-alvo da terapêutica. Nesse contexto, a terapia genética surge como uma alternativa que poderia contemplar uma ampla variedade de mutações e oferecer soluções permanentes para doenças monogênicas como a FC (MAULE, 2020).

TERAPIA	FASE CLÍNICA	PÚBLICO ALVO
Elexacaftor + tezacaftor + ivacaftor (Trikafta®)	Fase 4	<ul style="list-style-type: none"> • A partir de 12 anos • Uma cópia do F508del + outra mutação específica
Ivacaftor (Kalydeco®)	Fase 4	<ul style="list-style-type: none"> • A partir de 4 meses • Mutações específicas
Lumacaftor + ivacaftor (Orkambi®)	Fase 4	<ul style="list-style-type: none"> • A partir de 2 anos • Duas cópias do F508del
Tezacaftor + ivacaftor (Symdeko®)	Fase 4	<ul style="list-style-type: none"> • A partir de 12 anos • Duas cópias do F508del • Uma cópia do F508del + outra mutação específica
VX-121 + tezacaftor + VX-561	Fase 2	<ul style="list-style-type: none"> • A partir de 18 anos • Duas cópias do F508del • Uma cópia do F508del + outra mutação específica
ABBV-222	Fase 2	<ul style="list-style-type: none"> • A partir de 18 anos • Duas cópias do F508del

Quadro 4 - Principais moduladores do CFTR em estudo clínico

FONTE: Barry, 2021; Rosenfeld, 2019; Favia, 2020; Schwarz, 2021; Bell, 2019

Apesar dos moduladores do CFTR representarem um grande avanço para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com FC, as medicações disponíveis ainda são restritas a mutações específicas, limitando o público-alvo da terapêutica. Nesse contexto, a terapia genética surge como uma alternativa que poderia contemplar uma ampla variedade de mutações e oferecer soluções permanentes para doenças monogênicas como a FC (MAULE, 2020).

A terapia genética caracteriza-se pela introdução de genes normais recombinantes em células somáticas para tratamento de doenças genéticas. Essa transferência de genes, realizada através de vetores como adenovírus recombinantes e lipossomas, tem como objetivo, na FC, produzir expressão normal do gene CFTR (MAULE, 2020). Apesar de a FC apresentar manifestações multissistêmicas, a melhoria na função pulmonar apresenta-se como ponto principal na qualidade de vida dos pacientes fibrocísticos, sendo o principal alvo das terapias genéticas atualmente. Além disso, o sistema respiratório tem a vantagem de poder ser acessado através de terapias tópicas, como a nebulização (COONEY, 2015). O acesso do material genético até o epitélio pulmonar, entretanto, encontra algumas barreiras. A presença de muco espesso que impede o contato com o epitélio, a resposta imune contra vetores virais e a renovação constante do epitélio das vias aéreas são apenas algumas das barreiras naturais que desafiam o acesso e a transferência de genes de forma vetorial na FC (GUGGINO, 2017; MAULE, 2020).

Embora promissores, os estudos envolvendo terapia genética para FC ainda se encontram em fase pré-clínica. Beumer e colaboradores utilizaram o QR-010, um oligonucleotídeo experimental de RNA de fita simples, para reparação do RNAm na presença

de F508del. O estudo utilizou tanto células brônquicas humanas *in vitro* quanto camundongos *in vivo*, analisando o efluxo de cloreto em vias aéreas e a secreção salivar. Observou-se que o QR-010 restaurou a função do CFTR tanto em células humanas *in vitro* quanto de camundongos com F508del *in vivo* (BEUMER, 2015).

Outras terapias genéticas estão sendo desenvolvidas em fases pré-clínicas. Espera-se que em breve o avanço da biologia molecular e da farmacogenética possam oferecer terapêuticas acuradas e definitivas para doenças genéticas como a FC.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento a respeito dos aspectos genéticos da FC auxilia a comunidade médica devido ao fato de que as variantes gênicas proporcionam impacto direto nas manifestações clínicas e nas terapêuticas disponíveis para cada mutação. Diante disso, torna-se imprescindível atualizar-se não somente a respeito dos tratamentos convencionais das manifestações pulmonares e pancreáticas, mas também sobre as medicações alvo e sobre o papel da variedade genética nas suas indicações.

REFERÊNCIAS

ARONSON, P. S.; BORON, W. F.; EMILE, L. B. **O transporte de solutos e de água**. Fisiologia médica. 2ª edição. Rio de Janeiro. Elsevier. vol 1, p 124-125. 2015.

BAREIL, C.; BERGOUNOUX, A. **CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology**. Archives de Pédiatrie, v. 27, p. eS8-eS12, 2020.

BARRY, P. J. et al. **Triple Therapy for Cystic Fibrosis Phe508del–Gating and–Residual Function Genotypes**. New England Journal of Medicine, v. 385, n. 9, p. 815-825, 2021.

BELL, S. C. et al. **CFTR activity is enhanced by the novel corrector GLPG2222, given with and without ivacaftor in two randomized trials**. Journal of Cystic Fibrosis, v. 18, n. 5, p. 700-707, 2019.

BEUMER, W. et al. **WS01. 2 QR-010, an RNA therapy, restores CFTR function using in vitro and in vivo models of $\Delta F508$ CFTR**. Journal of Cystic Fibrosis, v. 14, p. S1, 2015.

CFF. **Patient Registry 2019 Annual Data Report**. Cystic Fibrosis Foundation. p 6-11. Bethesda, Maryland, 2020. Acessado em 04/08/2021. Disponível em <<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2019-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>>

CORREIA, C. A. A. et al. **Prevalência de seis mutações no gene CFTR em portadores de fibrose cística da região de Campinas**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 91-96, 2005.

CORVOL, H. et al. **Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis**. Nature communications, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2015.

COONEY, A. L.; MCCRAY JR, Paul B.; SINN, Patrick L. **Integrating viral and nonviral vectors for cystic fibrosis gene therapy in the airways.** Cyst. Fibros. Light New Res, 2015.

CUTTING, G. R. **Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application.** Nature Reviews Genetics, v. 16, n. 1, p. 45-56, 2015.

DE SOUZA, D. A. S. et al. **Cystic fibrosis in Afro-Brazilians: XK haplotypes analysis supports the European origin of p. F508del mutation.** Genetica, v. 145, n. 1, p. 19-25, 2017.

DRUMM, M. L.; COLLINS, Francis S. **Molecular biology of cystic fibrosis.** Mol Genet Med, v. 3, p. 33-68, 2013.

EGAN, M. E. **Cystic fibrosis transmembrane conductance receptor modulator therapy in cystic fibrosis, an update.** Current opinion in pediatrics, v. 32, n. 3, p. 384-388, 2020.

ELBORN, J. S. **Cystic fibrosis.** Lancet, v. 388, p. 2519-2531, 2016.

FAJAC, I.; WAINWRIGHT, Claire E. **New treatments targeting the basic defects in cystic fibrosis.** La Presse Médicale, v. 46, n. 6, p. e165-e175, 2017.

FARRELL, P. M.; ROCK, Michael J.; BAKER, Mei W. **The impact of the CFTR gene discovery on Cystic Fibrosis diagnosis, counseling, and preventive therapy.** Genes, v. 11, n. 4, p. 401, 2020.

FAVIA, M. et al. **Treatment of cystic fibrosis patients homozygous for F508del with lumacaftor-ivacaftor (Orkambi®) restores defective CFTR channel function in circulating mononuclear cells.** International journal of molecular sciences, v. 21, n. 7, p. 2398, 2020.

GUGGINO, W. B.; CEBOTARU, L. **Adeno-Associated Virus (AAV) gene therapy for cystic fibrosis: current barriers and recent developments.** Expert opinion on biological therapy, v. 17, n. 10, p. 1265-1273, 2017.

HEIJERMAN, H. G. M. et al. **Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial.** The Lancet, v. 394, n. 10212, p. 1940-1948, 2019.

KEOGH, R. H. et al. **Up-to-date and projected estimates of survival for people with cystic fibrosis using baseline characteristics: A longitudinal study using UK patient registry data.** Journal of Cystic Fibrosis, v. 17, n. 2, p. 218-227, 2018.

KRAMER, E. L.; CLANCY, J. P. **TGF β as a therapeutic target in cystic fibrosis.** Expert opinion on therapeutic targets, v. 22, n. 2, p. 177-189, 2018.

MAULE, G.; AROSIO, D.; CERESETO, A. **Gene therapy for cystic fibrosis: progress and challenges of genome editing.** International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 11, p. 3903, 2020.

MOTA, L. R. et al. **Estudos genéticos sobre a fibrose cística no brasil: uma revisão sistemática.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 14, n. 2, p. 238-245, 2015.

NOURKAMI-TUTDIBI, N. et al. **Genetic Association With Pseudomonas aeruginosa Acquisition in Cystic Fibrosis: Influence of Surfactant Protein D and Mannose-Binding Lectin.** *Frontiers in Immunology*, v. 12, p. 376, 2021.

RAFEEQ, M. M.; MURAD, H. A. S. **Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches.** *Journal of translational medicine*, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2017.

RASKIN, S. **Estudo multicêntrico das bases da genética molecular e da epidemiologia da fibrose cística em populações brasileiras.** Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná, 2001.

RIORDAN, J. R. et al. **Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA.** *Science*, v. 245, n. 4922, p. 1066-1073, 1989.

ROSA, K. M. da et al. **Características genéticas e fenotípicas de crianças e adolescentes com fibrose cística no Sul do Brasil.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 44, p. 498-504, 2018.

ROSENFELD, M. et al. **An open-label extension study of ivacaftor in children with CF and a CFTR gating mutation initiating treatment at age 2–5 years (KLIMB).** *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 18, n. 6, p. 838-843, 2019.

SCHWARZ, C. et al. **Tezacaftor/ivacaftor in people with cystic fibrosis who stopped lumacaftor/ivacaftor due to respiratory adverse events.** *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 20, n. 2, p. 228-233, 2021.

STEPHENSON, A. L. et al. **Survival comparison of patients with cystic fibrosis in Canada and the United States: a population-based cohort study.** *Annals of internal medicine*, v. 166, n. 8, p. 537-546, 2017.

TROUVÉ, P.; GÉNIN, E.; FÉREC, C.. **In silico search for modifier genes associated with pancreatic and liver disease in Cystic Fibrosis.** *PloS one*, v. 12, n. 3, p. e0173822, 2017.

QUON, B. S.; ROWE, S. M. **New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis.** *Bmj*, v. 352, 2016.

YANG, L. et al. **The association between variants in the CFTR gene and nonobstructive male infertility: A meta-analysis.** *Andrologia*, v. 52, n. 2, p. e13475, 2020.

WAINWRIGHT, C. E. et al. **Lumacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR.** *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 3, p. 220-231, 2015.

WELSH, M. J.; SMITH, A. E. **Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis.** *Cell*, v. 73, n. 7, p. 1251-1254, 1993.

CAPÍTULO 4

DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA DO POLIMORFISMO BDNF VAL66MET EM PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME DA BAHIA, BRASIL

Data de aceite: 01/10/2021

Data de submissão: 06/09/2021

Wellington dos Santos Silva

Faculdade Adventista da Bahia
Cacheira, Brasil
ORCID: 0000-0003-2943-7137

Tiago da Silva Lopes

Faculdade Adventista da Bahia; Programa
de Pós-graduação em Medicina e saúde,
Universidade Federal da Bahia
Salvador, Brasil
ORCID: 0000-0001-8280-240X

Danielle Palma Silva Barreto

Fundação Oswaldo Cruz: Instituto de
Pesquisas Gonçalo Moniz
Salvador, Brasil
ORCID: 0000-0002-4435-7621

Rita Lucena

Universidade Federal da Bahia
Salvador, Brasil
ORCID: 0000-0002-6190-9168

Abraão Fontes Baptista

Centro de Matemática, Computação, e
Cognição, Universidade Federal do ABC
São Bernardo do Campo, Brasil
ORCID: 0000-0001-7870-3820

Gabriel Santos da Silva

Faculdade Adventista da Bahia
Cacheira, Brasil
ORCID: 0000-0003-2224-2900

RESUMO: Introdução e objetivos: O polimorfismo de nucleotídeo único Val66Met no gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) exibe uma das maiores variabilidades em termos de distribuição alélica entre populações. Estudos sugerem que os portadores de BDNF met podem ter maior risco de dor pélvica ou abdominal crônica. O objetivo do presente estudo foi comparar a distribuição dos alelos Val66Met em um grupo de pacientes com doença falciforme com osteonecrose e sem osteonecrose.

Metodologia: O DNA foi isolado de leucócitos de sangue total usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, EUA) e mantido a 20°C. A genotipagem BDNF Val66Met foi realizada usando o método de sistema de mutação refratária amplificada com primer tetra (ARMS)-PCR. Genótipo e frequências de alelos foram determinados. Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg também foram examinados. Todas as análises estatísticas envolveram testes χ^2 executados em SPSS. **Resultados e conclusões:** As frequências foram de 0,93 para o alelo Val e 0,07 para o alelo Met. As frequências genótípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foi encontrada associação entre o polimorfismo Val66Met e os grupos estudados (χ^2 (4 fd) = 8.745; α = 0,068). Os dados deste estudo estendem os esforços para mapear a distribuição alélica do BDNF Val66Met em populações ao redor do mundo e enfatiza que a estratificação populacional deve ser controlada em estudos futuros que relatem associações fenotípicas em amostras de diferentes populações.

PALAVRAS-CHAVE: BDNF; Polimorfismo; Val66Met; Doença Falciforme.

ALLELIC DISTRIBUTION OF BDNF VAL66MET POLYMORPHISM IN SICKLE CELL DISEASE PATIENTS OF BAHIA, BRAZIL

ABSTRACT: Introduction and objectives: The Val66Met single-nucleotide polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) exhibits one of the highest variability in terms of allelic distribution between populations. Studies suggest that BDNF met carriers may be at higher risk for chronic pelvic or abdominal pain. The aim of the present study was to compare the distribution of Val66Met alleles in a group of patients with sickle cell disease with osteonecrosis and without osteonecrosis. **Methodology:** DNA was isolated from whole blood leukocytes using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) and kept at 20°C. BDNF Val66Met genotyping was performed using the tetra primer amplified refractory mutation system (ARMS)-PCR method. Genotype and allele frequencies were determined. Departures from Hardy-Weinberg equilibrium were also examined. All statistical analyses involved χ^2 tests run in SPSS. **Results and conclusions:** The frequencies were 0.93 for the Val allele and 0.07 for the Met allele. The genotype frequencies are in Hardy-Weinberg equilibrium and no association was found between the Val66Met polymorphism and the groups studied ($\chi^2(4 \text{ fd}) = 8,745; \alpha=0,068$). The data from this study extends efforts to map the allelic distribution of BDNF Val66Met in populations around the world and emphasizes that population stratification should be controlled for in future studies that report phenotypic associations in samples from different populations.

KEYWORDS: BDNF; Polymorphism Val66Met; Sickle Cell Disease.

11 INTRODUÇÃO

As Doenças Falciformes (DF) são um conjunto de doenças hereditárias cuja causa é a presença da hemoglobina S (HbS) proveniente de uma mutação pontual no gene da β -Globina, levando a substituição do aminoácido Ácido Glutâmico pela Valina na sexta posição das cadeias β . Existem outras hemoglobinas mutantes, como por exemplo, HbC, HbD, HbE, dentre outras que, associadas à HbS (SC, SD, SE), constituem o grupo denominado de doenças falciformes sendo a anemia falciforme (SS) a mais conhecida (CANÇADO; JESUS, 2007; KATO *et al.*, 2018). A anemia falciforme é a doença monogênica mais comum no Brasil e seu mecanismo de herança é autossômico recessivo, ou seja, indivíduos afetados herdam o alelo da HbS tanto do pai quanto da mãe.

O alelo HbS tem frequência elevada nas populações africanas e sua distribuição geográfica coincide com a distribuição geográfica do *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária. Indivíduos com HbS em heterozigose, quando infectados pelo *Plasmodium falciparum*, apresentam vantagem seletiva em relação aos indivíduos que não carregam esse alelo anômalo. Isso explica a elevada frequência deste alelo nas populações africanas em áreas onde a malária é endêmica e, conseqüentemente, a elevada incidência da doença nessas regiões (MEREMIKWU; OKOMO, 2016).

O gene da HbS foi introduzido no continente americano através do tráfico de africanos escravizados pelo Oceano Atlântico e sua distribuição no Brasil é bastante heterogênea

dependendo da composição negroide ou caucasóide da população. Assim, a prevalência de heterozigotos para a HbS é maior nas regiões norte e nordeste (6% a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2% a 3%). Existem mais de 2 milhões de portadores do traço (AS) e cerca de 30.000 indivíduos com anemia falciforme (SS). O número estimado de crianças que nascem com doenças falciformes é de um para cada mil nascimentos no país (CANÇADO; JESUS, 2007). A prevalência nos estados do Brasil varia de 1/650 na Bahia a 1/13.000 em Santa Catarina (tabela 1). Um estudo revelou uma proporção de crianças que nasceram com DF no Recôncavo Baiano de 1/314 colocando esta região como uma das regiões com maior frequência de hemoglobinas variantes no estado da Bahia (SILVA *et al.*, 2016).

DOENÇAS FALCIFORMES	
Estados	Proporção de nascidos vivos/ano
Bahia	1:650
Rio de Janeiro	1:1200
Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás	1:1400
Espírito Santo	1:1800
São Paulo	1:4000
Mato Grosso do Sul	1:5850
Rio Grande do Sul	1:11000
Santa Catarina e Paraná	1:13500

Tabela 1. Proporção de nascidos com doenças falciformes em alguns estados do Brasil que realizam o teste do pezinho.

*Extraído do artigo "A implantação do Programa de Doença Falciforme no Brasil." SUS: Mosaico de Inclusões, V. 13 Nº 2, 2011.

Nos últimos anos, tem surgido evidências crescentes sobre a presença de neuroplasticidade mal adaptativa de indivíduos com DF (CAMPBELL *et al.*, 2016; CASE *et al.*, 2017; DARBARI *et al.*, 2015), as quais são responsáveis por diversos problemas de saúde na DF, tais como, dor (DA SILVA *et al.*, 2019), ansiedade/depressão (TOUMI *et al.*, 2018) e déficit cognitivo (HARDY *et al.*, 2021).

Neste contexto de plasticidade neural, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) merece especial atenção pois está envolvido na regulação neural, manutenção e formação sináptica, tendo um papel importante na plasticidade do sistema nervoso central (PARK; POO, 2013). O gene BDNF está localizado no braço curto (p) do cromossomo 11 (11p13) e compreende 11 exons e 9 promotores funcionais (CHEN *et al.*, 2014; EGAN *et al.*, 2003) (SHEN *et al.*, 2018) Um polimorfismo funcional de ocorrência natural no gene do BDNF humano no nucleotídeo 196 (G/A) codifica uma substituição de aminoácido valina pela metionina na posição 66 (Val66Met ou Met66Met). Este polimorfismo resulta em menor

produção e quantidade circulante de BDNF e tem sido associado a maior suscetibilidade de distúrbios neurodegenerativos. Funcionalmente, os polimorfismos Met66Met e Val66Met causam prejuízos no tráfego intracelular e na secreção regulada em neurônios (CHEN *et al.*, 2014).

O polimorfismo de nucleotídeo único Val66Met (rs6265) no gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) exibe uma das maiores variabilidades em termos de distribuição alélica entre populações. Estudos sugerem que os portadores de BDNF Met podem estar em maior risco de dor pélvica ou abdominal crônica. O objetivo deste estudo piloto foi comparar a distribuição dos alelos Val66Met em um grupo de pacientes com doença falciforme com osteonecrose e sem osteonecrose.

METODOLOGIA

A amostra foi composta por 48 pacientes com DF sendo 24 com osteonecrose e 24 sem osteonecrose. O DNA foi isolado de leucócitos de sangue total usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, EUA) e mantido a 20 ° C. A genotipagem BDNF Val66Met foi realizada utilizando o método de sistema de mutação refratária amplificada com primer tetra (ARMS)-PCR (SHEIKH *et al.*, 2010). As amplificações de PCR foram realizadas em um volume de reação de 25 µl contendo 50 ng de molde de DNA genômico, 12,5 µl de PCR mastermix (2x) e todos os quatro primers [P1 (direto): 5'CCT ACA GTT CCA CCA GGT GAG AAG AGT G- 3'; P2 (reverso): 5'-TCA TGG ACA TGT TTG CAG CAT CTA GGT A-3'; P3 (específico do alelo G): 5'-CTG GTC CTC ATC CAA CAG CTC TTC TAT AAC-3'e P4 (específico do alelo A): 5'-ATC ATT GGC TGA CAC TTT CGA ACC CA-3']. O primeiro conjunto de primers (P1 e P2) amplifica a região de 401 bp contendo o SNP de interesse, enquanto o segundo conjunto (P3 e P4) de primers são alelos específicos e são responsáveis pela substituição G> A (VULTURAR *et al.*, 2016). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Brasília (CAAE 021.0.000.012-04).

RESULTADOS E CONCLUSÕES

As frequências foram de 0,93 para o alelo Val e 0,07 para o alelo Met. As frequências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foi encontrada associação entre o polimorfismo Val66Met e dor crônica osteoarticular em DF (χ^2 (4 fd) = 8.745; α = 0,068). As frequências encontradas nesse estudo são semelhantes às frequências encontradas para as populações africanas. Os resultados também corroboram outros estudos que não encontraram associação entre o polimorfismo Val66Met com níveis elevados de BDNF em pacientes com dor crônica. Uma limitação deste estudo é o tamanho da amostra. Portanto, mais estudos são necessários para saber as frequências dos alelos Val e Met na população da Bahia. Os dados deste estudo estendem os esforços para mapear a distribuição alélica

do BDNF Val66Met em populações ao redor do mundo e enfatiza que a estratificação populacional deve ser controlada em estudos futuros que relatem associações fenotípicas em amostras de diferentes populações.

FINANCIAMENTO

Fundo de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia através do Programa de Apoio a Núcleos Emergentes – PRONEM sob número 8133/2014 (PNE0020/2014).

REFERÊNCIAS

CAMPBELL, C. M., MOSCOU-JACKSON, G., CARROLL, C. P., KILEY, K., HAYWOOD, C., JR, LANZKRON, S., HAND, M., EDWARDS, R. R., & HAYTHORNTHWAITE, J. A. (2016). An **Evaluation of Central Sensitization in Patients With Sickle Cell Disease**. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, 17(5), 617–627.

CANÇADO, R. D., & JESUS, J. A. (2007). **A doença falciforme no Brasil**. *Revista Brasileira de Hematologia E Hemoterapia*, 29(3). <https://doi.org/10.1590/s1516-84842007000300002>.

CASE, M., ZHANG, H., MUNDAHL, J., DATTA, Y., NELSON, S., GUPTA, K., & HE, B. (2017). **Characterization of functional brain activity and connectivity using EEG and fMRI in patients with sickle cell disease**. *NeuroImage. Clinical*, 14, 1–17.

CHEN, W., WALWYN, W., ENNES, H. S., KIM, H., MCROBERTS, J. A., & MARVIZÓN, J. C. G. (2014). **BDNF released during neuropathic pain potentiates NMDA receptors in primary afferent terminals**. *The European Journal of Neuroscience*, 39(9), 1439–1454.

DA SILVA, J. T., LETZEN, J. E., HAYTHORNTHWAITE, J. A., FINAN, P. H., CAMPBELL, C. M., & SEMINOWICZ, D. A. (2019). **Do chronic pain and comorbidities affect brain function in sickle cell patients? A systematic review of neuroimaging and treatment approaches**. *Pain*, 160(9), 1933–1945.

DARBARI, D. S., HAMPSON, J. P., ICHESCO, E., KADOM, N., VEZINA, G., EVANGELOU, I., CLAUW, D. J., TAYLOR VI, J. G., & HARRIS, R. E. (2015). **Frequency of Hospitalizations for Pain and Association With Altered Brain Network Connectivity in Sickle Cell Disease**. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, 16(11), 1077–1086.

EGAN, M. F., KOJIMA, M., CALLICOTT, J. H., GOLDBERG, T. E., KOLACHANA, B. S., BERTOLINO, A., ZAITSEV, E., GOLD, B., GOLDMAN, D., DEAN, M., LU, B., & WEINBERGER, D. R. (2003). **The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function**. *Cell*, 112(2), 257–269.

HARDY, R. A., RACHED, N. A., JONES, J. A., ARCHER, D. R., & HYACINTH, H. I. (2021). **Role of age and neuroinflammation in the mechanism of cognitive deficits in sickle cell disease**. *Experimental Biology and Medicine*, 246(1), 106–120.

KATO, G. J., PIEL, F. B., REID, C. D., GASTON, M. H., OHENE-FREMPONG, K., KRISHNAMURTI, L., SMITH, W. R., PANEPINTO, J. A., WEATHERALL, D. J., COSTA, F. F., & VICHINSKY, E. P. (2018). **Sickle cell disease**. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4, 18010.

MEREMIKWU, M. M., & OKOMO, U. (2016). **Sickle cell disease**. BMJ Clinical Evidence, 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26808098>

PARK, H., & POO, M.-M. (2013). **Neurotrophin regulation of neural circuit development and function**. In Nature Reviews Neuroscience (Vol. 14, Issue 1, pp. 7–23). <https://doi.org/10.1038/nrn3379>.

SHEIKH H. I., HAYDEN E. P., KRYSKI K. R., SMITH H. J., SINGH S. M., **Genotyping the BDNF rs6265 (Val66Met) polymorphism by one-step amplified refractory mutation system PCR**, Psychiatr. Genet., 2010, 20, 109-112.

SILVA, W. S., DE OLIVEIRA, R. F., RIBEIRO, S. B., DA SILVA, I. B., DE ARAÚJO, E. M., & BAPTISTA, A. F. (2016). **Screening for Structural Hemoglobin Variants in Bahia, Brazil**. International Journal of Environmental Research and Public Health, 13(2), 225.

TOUMI, M. L., MERZOUG, S., & BOULASSEL, M. R. (2018). **Does sickle cell disease have a psychosomatic component?** A particular focus on anxiety and depression. Life Sciences, 210, 96–105.

VULTURAR, R., CHIȘ, A., HAMBRICH, M., KELEMEN, B., UNGUREANU, L. & MIU, A. (2016). **Allelic distribution of BDNF Val66Met polymorphism in healthy Romanian volunteers**. Translational Neuroscience. 7(1), 31-34.

CAPÍTULO 5

DNA REPAIR GENES POLYMORPHISMS: INFLUENCE UPON SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND ITS CLINICAL MANIFESTATIONS

Data de aceite: 01/10/2021

Paula Sandrin-Garcia

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; Department of Genetics, Federal University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

Suelen Cristina de Lima

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

Jaqueline de Azevêdo Silva

Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; Department of Genetics, Federal University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

Nadja Maria Jorge Asano

Division of Clinical Medicine, Clinical Hospital of Pernambuco, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Gisele Vagjel Fernandes

Division of Nephrology, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco Recife, Brazil

Lucila Maria Valente

Division of Nephrology, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Paulo Roberto Eleutério de Souza

Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Sergio Crovella

Department of Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, Doha, State of Qatar.

ABSTRACT: DNA repair genes polymorphisms can contribute for increased damage in autoimmune diseases, considering that accumulated DNA damage promotes chronic inflammatory processes. Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder characterized by chronic inflammatory response and a wide spectrum of clinical manifestations. SLE patients display an inefficient DNA repair mechanism and some genes have been associated with this process. *LIG4* and *STK17A* are genes involved in the main pathways to repairing DNA damage. Therefore, we assessed five Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the DNA repair *LIG4* and *STK17A* genes, and its possible association in SLE development and clinical manifestations. Genotyping was performed using fluorogenic probes Taqman® in 202 SLE patients and 190 healthy individuals from the Northeast Brazilian population. We observed a protective factor for *LIG4* SNP rs3093740 G/T genotype (OR = 0.32, p = 0.018) against nephrite development and for *STK17A* SNP rs2330875 in A (OR= 0.47, p = 0.007) allele and A/A genotype (OR = 0.15, p = 0.010) to malar rash development in SLE patients. Our results suggested that DNA repair genes *LIG4* and *STK17A* polymorphisms are associated with some clinical SLE features

highlighting the important role of DNA repair pathways upon disease's course.

KEYWORDS: DNA repair genes; *LIG4*; *STK17A*; Systemic Lupus Erythematosus; SNPs

1 | INTRODUCTION

DNA repair genes are known to be impaired in SLE individuals causing excessive DNA damage accumulation, which may increase clinical features in disease (Bassi et al., 2008; Choi et al., 2012; Jahantigh et al., 2015; Mireles-Canales et al., 2018). Double strand breaks (DSB) are the most critical damage to the cells and is a marker of environmental stress in which both strands of DNA are affected inducing loss of genetic material, mutagenesis, apoptosis and disease activity in lupus (Danoy et al., 2008; Rastogi et al., 2010; Namas et al., 2016). Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder presenting diverse clinical manifestations with involvement of several organ and systems. SLE is a disease characterized by deregulated inflammatory response, in which the immune system fails to distinguish self from non-self (Magalhães et al., 2003; Tsokos 2011).

Altered immune responses, including the loss of self-tolerance with subsequent deregulation of the immune system are the result of genetic, hormonal and environmental factors (Tsokos 2011; Liu and Lu 2020). Ultraviolet (UV) light exposure is an environmental factor that produces reactive oxygen species (ROS) that might induce DNA damage (Hanssen-Bauer et al., 2012). Accumulation of DNA damage leads to the production of autoreactive antibodies and immune complexes that accumulate in various tissues and organs increasing the damage and inflammation (Braunwald et al., 2011; Jahantigh et al., 2015). In this context, Tumurkhuu et al. (2020) observed that oxidative DNA damage accelerates skin inflammation in lupus-induced mice model.

Those cells with DNA damage can follow two major DNA repair pathways: homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) (Sonoda et al., 2006). DNA ligases protein family are involved in DNA-end-joining mechanisms in DSB repair. DNA *LIG4*, located on 13q33.34, encodes *LIGIV* protein, which forms complexes with *XRCC4* protein acting directly in NHEJ pathway (Burma et al., 2006; Davies et al., 2012) being the most used DSB repair mechanism. NHEJ pathway promotes DNA DSB repair in cells deficient of HR, and there is evidence that it operates at all stages of the cell cycle (Yu et al., 2020).

The gene serine/threonine kinase 17a (*STK17A*), located on chromosome 7p13, encodes a nuclear protein autophosphorylated also known as *DRAK1* (protein kinase related apoptosis inducing *PAD1*) (Ashurst et al., 2005). *STK17A* knockdown in human embryonic carcinoma results in decreased reactive oxygen species (ROS) associated with increased expression of antioxidant genes (Mao et al., 2011). *STK17A* regulates nuclear processes in response to DNA damage in the cascade of intracellular protein kinase (Sanjo et al., 1998) and its related with several cell death signaling pathways (Mao et al., 2011).

Therefore, oxidative stress performs a crucial role in SLE (Shah et al., 2014; Fujii et al., 2015) and *LIG4* and *SKT17A* are main genes involved in the DSB repair mechanisms into DNA (Bassi et al., 2008). Association studies between *LIG4* and *SKT17A* and DNA repair/damage are well established in some diseases such as cancer, however, only a few studies evaluated the association of these genes in autoimmune diseases (Da Silva Fonseca et al., 2013; De Azevêdo Silva et al., 2014; Wei and Liu 2020).

In this study, we assessed SNPs in *LIG4* and *SKT17A* in SLE patients and healthy controls in a Northeast Brazilian population in order to understand the relationship between development or clinical manifestations of SLE and DNA repair genes.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 Patients and controls

We performed a case-control study enrolling 202 SLE patients (96.1% females and 3.9% males), mean age 34,05 years $SD \pm 8.74$ years, selected from Nephrology Division from the Clinical Hospital at Federal University of Pernambuco (UFPE) between August 2015 and July 2017. All were >18 years of age, unrelated, with the criteria of Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology - Damage Index (SLICC/ACR). The following laboratorial and clinical data regarding the SLE patients were collected: hematological alterations (hemolytic anemia, leucopenia, lymphopenia, thrombocytopenia), immunological alterations (Anticardiolipin, Anti-Sm, Anti-RNP), presence of antinuclear antibodies (ANA), photosensitivity, serositis (pleuritis, pericarditis), arthritis, cutaneous manifestations (malar or discoid rashes), oral ulcers, neuropsychiatric disorder (seizures, headache, psychosis) and nephritic disorder. The diagnosis of the nephrite was histologically confirmed by renal biopsy.

The control group consisted of 190 healthy individuals (75.8% females and 24.2% males), mean age 32 years old ($SD \pm 13$ years old), from Metropolitan region of Recife, Pernambuco, Northeast of Brazil.

All individuals provided written informed consent and the local ethics committee (CAAE n° 24374913.0.0000.5208) approved this study.

Clinical manifestations regarding sex and age described in our SLE group are show in Table 1.

Demographic and clinical / laboratorial characteristics	SLE n=202
Sex	
Male	3.96%
Female	96.03%
ACR Characteristics	
Malar Rash	67.82%
Discoid Rash	33.66%
Photosensitivity	70.29%
Arthritis	60.39%
Oral Ulcerations	59.90%
Serositis	35.15%
Hematological alterations	23.76%
Nephritic disorder	45.05%
Neuropsychiatric disorder	38.12%
ANA+	49.50%
Immunological alterations	60.89%

Table 1. Clinical features from the SLE patients studied.

2.2 DNA/RNA Isolation and cDNA Synthesis

Genomic DNA was isolated from whole blood samples in both assessed groups using the Salting Out method (Sambrook and Russell, 2006). Total RNA was isolated using Trizol Reagent (Invitrogen, USA) according to manufacturer's instructions. RNA integrity was verified by 1.5% agarose gel electrophoresis and the RNA quantification/quality was verified by Nanodrop ND 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc, Delaware, USA). The cDNA synthesis was performed with 500 ng of RNA input from each sample and using GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA) following the manufacturer's instructions.

2.3 Polymorphisms Analysis

SNPs were selected using SNPBrowser software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) according the following criteria: Minor Frequency Allele (MAF), TagSNPs and gene coverage. The SNPs rs10131, rs1805388, rs3093740 (*LIG4*) and rs7805969, rs2330875 (*STK17A*) were genotyped with Taqman SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) using the ABI 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

The chi-square test (χ^2) was used to assess the Hardy-Weinberg equilibrium in the studied population. The data analysis was performed by Fisher's exact test, along with SNPStats tool and the R version 3.0.2 program (<http://cran.r-project.org/mirrors.html>).

3 | RESULTS

A total of 392 subjects were genotyped, including 202 SLE patients (51.53%) and 190 healthy controls (48.47%). All frequencies assessed were in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) in SLE patients and health control groups except for rs1805388 (*LIG4*) and rs2330875 (*STK17A*) in both groups ($p < 0.05$).

The allele and genotypic frequencies for *LIG4* and *STK17A* SNPs were assessed and no significant association was observed for polymorphisms tested with SLE development (Table 2). When considering clinical features we identified two polymorphisms with protection for SLE patients (Table 3). For *LIG4* SNP rs3093740, we observed association between G/T genotype (OR = 0.32, CI = 0.10-0.89, $p = 0.018$) with lower susceptibility to nephrite development. *STK17A* SNP rs2330875 was associated with A allele (OR = 0.47, CI = 0.27-0.84, $p = 0.007$) and A/A genotype (OR = 0.15, CI = 0.02-0.78, $p = 0.010$) with lower susceptibility to malar rash. No association was observed for remaining clinical manifestations tested ($p > 0.05$).

GENE	SNP	Controls		Patients		OR	CI (95%)	P	
		N*	%	N*	%				
LIG4	rs1805388	G	289	84.5	331	87.56	1.00		
		A	53	15.49	47	12.43	0.77	0,49 – 1.21	0.238
		GG	119	69.6	142	75.1	1.00		
		AG	51	29.8	47	24.9	0.77	0.47 – 1.26	0.288
		AA	1	0.6	0	0	NA	NA – 32,96	0.458
			HWE $p=0.083$		HWE $p=0.084$				
	rs10131	C	236	84.53	231	85.55	1.00		
		T	43	15.46	39	14.44	0.93	0.56 – 1.52	0.811
		CC	101	72.7	98	72.6	1.00		
		CT	33	23.7	35	25.9	1.09	0.61 – 1.97	0.780
		TT	5	3.6	2	1.5	0.41	0.04 – 2.60	0.446
			HWE $p=0.32$		HWE $p=0.74$				
	rs3093740	T	331	85.3	359	92.52	1.00		
		G	25	7.02	29	7.47	1.07	0.59 – 1.94	0.888
		TT	155	87.1	167	86.1	1.00		
GT		21	11.8	25	12.9	1.10	0.57 – 2.17	0.875	
GG		2	1.1	2	1	0.93	0.07 – 12.95	1.000	
		HWE $p=0.2$		HWE $p=0.28$					
STK17A	rs7805969	G	138	39.65	142	37.36	1.00		
		A	210	60.34	238	62.63	1.11	0.81 – 1.51	0.542
		GG	68	39.1	74	39	1.00		
		AG	74	42.5	90	47.4	1.12	0.69 – 1.80	0.647
		AA	32	18.4	26	13.7	0.75	0.38 – 1.44	0.436
		HWE $p=0.15$		HWE $p=1$					
rs2330875	T	90	27.77	76	22.7	1.00			
	A	234	72.22	258	77.24	1.30	0.90 – 1.89	0.151	
	TT	89	54.9	100	59.9	1.00			
	AT	56	34.6	58	34.7	0.92	0.56 – 1.51	0.812	
	AA	17	10.5	9	5.4	0.47	0.18 – 1.19	0.096	
		HWE $p=0.08$		HWE $p=0.83$					

Table 2. Genotype and allele frequencies from LIG4 and STK17A in Systemic Lupus Erythematosus patients (SLE) and healthy controls (HC).

* Due to technical issues, some samples were not genotyped. OR - Odds Ratio; CI - Confidence Interval; P - p-value; HWE – Hardy-Weinberg Equilibrium; NA - Not Available.

GENE (SNP)	CLINICAL FEATURE (CL)	Patients without CL		Patients with CL		OR	CI (95%)	P	
		N	%	N	%				
LIG4 (rs3093740)	Nephrite	T	187	90	172	96	1.00		
		G	21	10	8	4	0.41	0.15 – 1.01	0.051
		TT	84	81	83	92	1.00		
		GT	19	18	6	7	0.32	0.10 – 0.89	0.018
		GG	1	1	1	1	1.01	0.01 – 80.32	1
STK17A (rs2330875)	Malar Rash	T	66	67	192	81	1.00		
		A	32	33	44	19	0.47	0.27 – 0.84	0.007
		TT	23	47	77	65	1.00		
		AT	20	41	38	32	0.57	0.26 – 1.24	0.139
		AA	6	12	3	3	0.15	0.02 – 0.78	0.010

Table 3. Clinical features associated with SNPs from *LIG4* and *STK17A* in Systemic Lupus Erythematosus by Fisher's exact test.

* Due to technical issues, some samples were not genotyped; OR - Odds Ratio; CI - Confidence Interval; P - p-value.

4 | DISCUSSION

Genetic factors may confer a predisposition to development of SLE by the combined effect of polymorphisms in a large number of genes involved in various pathways, among these DNA repair genes pinpoint their importance in disease development (Bassi et al., 2008; Jahantigh et al., 2015; Mireles-Canales et al., 2018). In this study, we evaluated the possible association between *LIG4* and *STK17A* and SLE development and clinical features.

In this study we identified a G/T genotype association between *LIG4* SNP rs3093740 and nephrite in SLE patients indicating lower susceptibility to this clinical feature. The *LIG4* SNP rs3093740 is a TagSNP and is tagged by rs1805388, which in our study was not associated with the disease or its clinical characteristics. Polymorphisms in DSB repair genes could influence individually or in combination on the efficacy of DSB repair processes, or even act as a protective factor (Yin et al., 2012; Mumbreakar et al., 2016). Unresolved DSB lead to apoptosis with subsequent accumulation of immune complexes in tissue organs, including

kidneys, being a more important cause associated with worsening SLE (Tsokos 2011, Liu et al., 2013). When DNA repair mechanisms as HR are defective, alternative pathways as NHEJ are triggered (Yu et al., 2020). Our results suggest that SNPs in *LIG4*, involved directly in NHEJ repair, might influence clinical features development in SLE patients. Jahantigh et al. (2015) performed a genetic association study with DNA repair genes *XRCC5*, *XRCC6* and *XRCC7*, also involved in NHEJ pathway, and observed that the genotypes with *XRCC5* VNTR OR allele (rs6147172) and *XRCC7* 6721G allele (rs7003908) could be risk factors for SLE susceptibility.

The A allele and A/A genotype of *STK17A* SNP rs2330875 were associated to lower susceptibility to malar rash in SLE patients. Agreeing to our results, another *STK17A* polymorphism (rs7805969) also was associated with lower susceptibility to cutaneous alterations in a Southeast Brazilian population, although a risk to SLE and others clinical features, as arthritis and immunological alterations were observed for authors (Da Silva Fonseca et al., 2013). UV light exposure is capable of producing DSB, leading to direct or subsequent DNA oxidative damage (Rastogi et al., 2010; Souliotis et al., 2019). *STK17A* regulates nuclear processes in response to DNA oxidative damage and is involved in apoptotic pathway, being activated in response to environmental factors, such as UV light exposition (Sanjo et al., 1998; Mao et al 2011). Oxidative stress performs a crucial role in SLE, being used as biomarker to the disease (Shah et al., 2014; Fujii 2015; Tumurkhuu et al., 2020). Individuals with SLE show increased cutaneous manifestations in response to DNA breaks, induced by immune response due to apoptotic bodies' deposition and subsequent immune complexes formation (Meas et al., 2017), justifying inflammation and rash after UV light skin exposition.

Although exposure to UV radiation has been shown as related to development of various clinical manifestations in SLE, in the present study in Northeast Brazilian population, the *LIG4* and *STK17A* were photoprotective factors to SLE clinical features. Northeast Brazilian population often had a higher UV-light exposure when compared to the other regions in Brazil, resulting in a higher melanin production. Melanin, in turn, acts as a natural protection from sunlight exposition (Bohm et al., 2005). In addition, smaller quantities of ROS induce less DSB formation and less recruitment of DNA repair proteins.

5 | CONCLUSIONS

We identified that polymorphisms within DNA repair genes might influence SLE susceptibility and its clinical features such as malar rash and nephrite highlighting the importance of studying another DNA repair genes polymorphisms and the potential role of DNA repair pathway impairment upon disease's course.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Capes, CNPq and FACEPE.

REFERENCES

- Ashurst JL, Chen CK, Gilbert JG, Jekosch K, Keenan S, Meidl P, Searle SM, Stalker J, Storey R, Trevanion S, Wilming L, Hubbard T. (2005). **The Vertebrate Genome Annotation (Vega) database**. *Nucleic Acids Res* 33:459–65.
- Bassi C, Xavier DJ, Palomino G, Nicolucci P, Soares C, Sakamoto-Hojo E, Donadi E. (2008). **Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus**. *Lupus* 17:988–995.
- Bohm M, Wolff I, Scholzen TE et al (2005) **Alpha-melanocystestimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage**. *J Biol Chem* 7:5795–5802. doi:10.1074/jbc.M406334200.
- Braunwald, E., Zipes, D.P., Et AL - **Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**, 9th ed, Saunders Elsevier, 2011. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia (2009 - 2013). Disponível em <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/>
- Burma, S., Chen, B. P. C., & Chen, D. J. (2006). **Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity**. *DNA Repair*, 5(9-10), 1042–1048. <http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.026>
- Choi J, Kim ST, Craft J. (2012). **The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update**. *Curr Opin Immunol* 24(6):651-7.
- Da Silva Fonseca AM, de Azevedo Silva J, Pancotto JA, Donadi EA, Segat L, Crovella S, Sandrin-Garcia P. 2013. **Polymorphisms in STK17A gene are associated with systemic lupus erythematosus and its clinical manifestations**. *Gene*. Sep 25;527(2):435-9. doi: 10.1016/j.gene.2013.06.074.
- De Azevêdo Silva J, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P. **LIG4 and RAD52 DNA repair genes polymorphisms and systemic lupus erythematosus**. *Mol Biol Rep*. 2014;41(4):2249-56. doi: 10.1007/s11033-014-3076-y. Epub 2014 Jan 12. PMID: 24415301.
- Danoy, P., Michiels, S., Dessen, P., Pignat, C., Boulet, T., Monet, M., Bouchardy, C., Lathrop, M., Sarasin, A., Benhamou, S. 2008. **Variants in DNA double-strand break repair and DNA damage-response genes and susceptibility to lung and head and neck cancers**. *International journal of cancer*. Journal international du cancer. v.123: 457–63.
- Davies, R. C., Pettijohn, K., Fike, F., Wang, J., Nahas, S. a, Tunuguntla, R., McCurdy, D. (2012). **Defective DNA double-strand break repair in pediatric systemic lupus erythematosus**. *Arthritis and Rheumatism*, 64(2), 568–78. <http://doi.org/10.1002/art.33334>

Fujii, J. (2015). **Oxidative stress as a potential causal factor for autoimmune hemolytic anemia and systemic lupus erythematosus.** *World Journal of Nephrology*, 4(2), 213. <http://doi.org/10.5527/wjn.v4.i2.213>

Hanssen-Bauer, A., Solvang-Garten, K., Akbari, M., & Otterlei, M. (2012). **X-ray Repair Cross Complementing protein 1 in base excision repair.** *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 17210–17229. <http://doi.org/10.3390/ijms131217210>

Jahantigh, D., Salimi, S., Mousavi, M., Moossavi, M., Mohammadoo-Khorasani, M., Narooei-nejad, M., & Sandoughi, M. (2015). **Association Between Functional Polymorphisms of DNA Double-Strand Breaks in Repair Genes XRCC5, XRCC6 and XRCC7 with the Risk of Systemic Lupus Erythematosus in South East Iran.** *DNA and Cell Biology*, 34(5), 360–366. <http://doi.org/10.1089/dna.2014.2465>

Liu CC, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM. (2013). **Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future.** *Ther Adv Musculoskelet Dis* 5(4):210–33.

Lin X, Lu L. **B Cell-Mediated Autoimmune Diseases.** *Adv Exp Med Biol*. 2020;1254:145-160. doi: 10.1007/978-981-15-3532-1_11. PMID: 32323275.

Magalhães, M. B., Donadi, E. a., & Louzada, P. (2003). **Manifestações clínicas do lúpus eritematoso sistêmico: Abordagem diagnóstica e terapêutica na sala de urgência.** *Medicina*, 36(2-4), 409–417.

Mao, P., Hever, M. P., Niemaszyk, L. M., Haghkerdar, J. M., Yanco, E. G., Desai, D., Spinella, M. J. (2011). **Serine/threonine kinase 17A is a novel p53 target gene and modulator of cisplatin toxicity and reactive oxygen species in testicular cancer cells.** *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19381–19391. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.218040>

Meas, R., Burak, M. J., & Sweasy, J. B. (2017). **DNA repair and systemic lupus erythematosus.** *DNA repair*, 56, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.020>

Mireles-Canales MP, González-Chávez SA, Quiñonez-Flores CM, León-López EA, Pacheco-Tena C. **DNA Damage and Deficiencies in the Mechanisms of Its Repair: Implications in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus.** *J Immunol Res*. 2018 Jul 12;2018:8214379. doi: 10.1155/2018/8214379. PMID: 30116756; PMCID: PMC6079408.

Mumbreakar KD, Goutham HV, Vadhiraaja BM, Bola Sadashiva SR. **Polymorphisms in double strand break repair related genes influence radiosensitivity phenotype in lymphocytes from healthy individuals.** *DNA Repair (Amst)*. 2016 Apr;40:27-34. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.02.006. Epub 2016 Mar 4.

Namas R, Renauer P, Ognenovski M, Tsou PS, Sawalha AH. **Histone H2AX phosphorylation as a measure of DNA double-strand breaks and a marker of environmental stress and disease activity in lupus.** *Lupus Sci Med*. 2016 Apr 29;3(1):e000148. doi: 10.1136/lupus-2016-000148. PMID: 27158526; PMCID: PMC4854117.

Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). **Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair.** *Journal of Nucleic Acids*, 2010, 592980. <http://doi.org/10.4061/2010/592980>

Sambrook J, Russell DW. (2006). **Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform.** CSH Protoc. 1;2006(1).

Sanjo H, Kawai T, Akira S. (1998). **DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis.** J Biol Chem 44:29066–71.

Shah, D., Mahajan, N., Sah, S., Nath, S. K., & Paudyal, B. (2014). **Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus.** Journal of Biomedical Science, 21(1), 23. <http://doi.org/10.1186/1423-0127-21-23>

Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., & Takeda, S. (2006). **Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair.** DNA Repair, 5(9-10), 1021–9. <http://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.022>

Tsokos GC. (2011). **Systemic lupus erythematosus.** N Engl J Med 1;365(22):2110-21.

Tumurkhuu G, Chen S, Montano EN, Ercan Laguna D, De Los Santos G, Yu JM, Lane M, Yamashita M, Markman JL, Blanco LP, Kaplan MJ, Shimada K, Crother TR, Ishimori M, Wallace DJ, Jefferies CA, Arditi M. **Oxidative DNA Damage Accelerates Skin Inflammation in Pristane-Induced Lupus Model.** Front Immunol. 2020 Sep 24;11:554725. doi: 10.3389/fimmu.2020.554725. PMID: 33072095; PMCID: PMC7541920.

Wei W, Liu C. **Prognostic and predictive roles of microRNA411 and its target STK17A in evaluating radiotherapy efficacy and their effects on cell migration and invasion via the p53 signaling pathway in cervical cancer.** Mol Med Rep. 2020;21(1):267-281. doi:10.3892/mmr.2019.10826

Souliotis, V. L., Vlachogiannis, N. I., Pappa, M., Argyriou, A., Ntouros, P. A., & Sfikakis, P. P. (2019). **DNA Damage Response and Oxidative Stress in Systemic Autoimmunity.** International journal of molecular sciences, 21(1), 55. <https://doi.org/10.3390/ijms21010055>

Yin M, Liao Z, Liu Z, Wang LE, O'Reilly M, Gomez D, Li M, Komaki R, Wei Q. **Genetic variants of the nonhomologous end joining gene LIG4 and severe radiation pneumonitis in nonsmall cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy.** Cancer. 2012 Jan 15;118(2):528-35. doi: 10.1002/cncr.26214. Epub 2011 Jun 29.

Yu, W., Lescale, C., Babin, L. et al. **Repair of G1 induced DNA double-strand breaks in S-G2/M by alternative NHEJ.** Nat Commun 11, 5239 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19060-w>.

GENÉTICA FORENSE APLICADA À INVESTIGAÇÃO DE CRIMES SEXUAIS

Data de aceite: 01/10/2021

Data de submissão: 23/06/2021

Angela Aparecida de Oliveira

Universidade José do Rosário Vellano
Alfenas-MG
<https://orcid.org/0000-0003-1328-034X>

Darlene Cabral

Universidade José do Rosário Vellano
Alfenas-MG
<https://orcid.org/0000-0002-2107-774X>

Danielly Beraldo dos Santos Silva

Universidade José do Rosário Vellano
Alfenas-MG
<https://orcid.org/0000-0002-3144-7476>

RESUMO: As ciências forenses, em sua abordagem multidisciplinar, vêm sendo amplamente utilizada na investigação de casos do sistema de justiça criminal. Neste contexto, uma das suas subdivisões conhecida como DNA forense (ou genética forense) utiliza de técnicas moleculares a fim de vincular uma evidência de origem biológica à um suspeito através de seu DNA. Deste modo, este capítulo tem como objetivo discutir o uso do DNA forense como ferramenta para a solução de crimes sexuais. Para tanto, foram realizadas buscas nas bases de dados: PubMed, Google acadêmico e Scielo. Além disso, também foram pesquisados artigos nas bases jurídicas do país. Foram incluídos artigos em português e inglês que pudessem fundamentar a discussão sobre a aplicação do

DNA forense na investigação de crimes sexuais. Como resultado, foi possível identificar que o DNA forense pode ser extremamente útil na investigação forense de crimes pela possibilidade de associação entre o conteúdo genético presente nos fluidos coletados na situação do crime com o DNA do suspeito. A genética forense constitui-se de um excelente ferramenta na investigação de crimes mas seu uso tem sido limitado por fatores econômicos.

PALAVRAS-CHAVE: DNA, ciências forenses, delitos sexuais, PCR

FORENSIC GENETIC APPLIED IN THE INVESTIGATION OF SEXUAL CRIMES

ABSTRACT: Forensic science, in its multidisciplinary approach, has been widely used in the investigation of cases in the criminal justice system. In this context, one of its subdivisions known as forensic DNA (or forensic genetics) using molecular techniques in order to link evidence of biological origin to a suspect through their DNA. Thus, this chapter aims to discuss the use of forensic DNA as a tool for solving sex crimes. Therefore, searches were performed in the databases: PubMed, Academic Google and Scielo. In addition, articles in the country's legal bases were also searched. Articles in Portuguese and English that could directly or indirectly support the discussion on the application of forensic DNA in the investigation of sexual crimes were included. As a result, it was possible to identify that forensic DNA can be extremely useful in forensic investigation of crimes by the possibility of associating the genetic content present in the fluids collected in the crime situation with the

suspect's DNA. Forensic genetic is an excellent tool in the investigation of crimes, but its use has been limited by economic factors.

KEYWORDS: DNA, Forensic Sciences, Sex Offenses, PCR

1 | INTRODUÇÃO

O termo “ciências forenses” vem sendo empregado para designar um conjunto de disciplinas que se concentram na investigação de casos do sistema de justiça criminal. Dentre elas é possível destacar o DNA forense, também conhecido como genética forense. Esta subcategoria utiliza técnicas de biologia molecular com a finalidade de associar uma evidência criminal de origem biológica à um potencial suspeito através de seu DNA (ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*) (DECANINE, 2016).

O DNA é uma molécula composta de duas cadeias polinucleotídicas em formato de dupla hélice que carregam informações genéticas para o desenvolvimento de todos os organismos. Os nucleotídeos são compostos formados pela ligação covalente entre um açúcar chamado desoxirribose, um grupo fosfato e uma base nitrogenada (citosina [C], guanina [G], adenina [A] ou timina [T]). Deste modo, a variação da sequência e proporção dessas bases é o que torna os organismos diferentes uns dos outros. Sendo assim, o conhecimento sobre a variabilidade genética tem sido utilizada como ferramenta nas investigações criminais (ALBERTS *et al.*, 2010).

A principal técnica molecular utilizada nas análises forenses é a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase chain reaction*). Este método de análise envolve a multiplicação de regiões do DNA contendo pares de bases nitrogenadas repetidas diversas vezes. Devido a alta variabilidade dessas regiões, a frequência desses alelos pode ser calculada para atestar o princípio da individualidade. Desta maneira, esta ferramenta pode ser extremamente útil na investigação forense de crimes de natureza sexual (NUSSBAUM, 2008).

O abuso sexual pode ser caracterizado por uma atividade sexual (estupro, carícias ou contato íntimo) sem consentimento ou incapacidade para compreender o ato. Nestas situações, as agressões sexuais se diferenciam de outros tipos de abuso pelo fato do comportamento sexual ser forçado e inapropriado, gerando sentimento de repulsa e violação por parte da vítima. Desta maneira, este tipo de crime pode ainda levar sequelas a saúde do paciente. As vítimas podem apresentar ainda quadros de estresse pós traumático, gravidez indesejada e até mesmo o aparecimento de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) (ARAUJO, 2002).

Ao contrário de outros crimes, em que a investigação concentra-se na cena do crime, nos casos de agressão sexual a própria vítima constitui a “cena” primária. Como resultado dos avanços científicos nos últimos anos, a análise de DNA de fluidos biológicos e manchas em tecido ou no ambiente, aumentou a possibilidade de identificação dos agressores. Deste

modo, o perfil de DNA da vítima pode ser obtido a partir de *swab* das regiões genais ou unhas do suspeito. Por outro lado, o perfil de DNA do agressor pode ser obtido de tecido da pele ou sangue coletado debaixo das unhas da vítima. Sendo assim, através dos avanços das técnicas envolvendo o DNA, a perícia criminal passa a ser fundamental na absolvição ou condenação de um réu acusado de cometer um crime de violência sexual (JOHNSON *et al.*, 2012). Diante do exposto, este capítulo reúne os principais conceitos e achados sobre as técnicas moleculares aplicados aos crimes sexuais.

2 | CIÊNCIAS FORENSES

O termo “ciências forenses” descreve a ação de associar pessoas, lugares ou coisas a uma determinada atividade criminal. A palavra “forense” é derivada do latim, *fórum*, que significa público, fazendo referência aos lugares de discussões e debates no período romano. Todavia, o termo “ciência forense” faz referência especificamente à área criminal encarregada de investigar potenciais crimes (HOUCK; SIEGEL, 2009). De acordo com o dicionário de Oxford, ciências forenses remete a aplicação da análise científica em um contexto legal que desempenha um papel vital na resolução de crimes. Em definição mais restritiva (RIBAUX *et al.*, 2010), define o termo como: “a aplicação da ciência para resolver questões relacionadas com a lei”.

Em alguns casos, a coleta de evidências forenses é a única forma de estabelecer ou excluir uma associação entre o suspeito e a vítima ou cena do crime. Deste modo, é possível afirmar que a área forense é caracterizada por ser uma ciência multidisciplinar. Neste contexto, pode-se dizer que diferentes abordagens, subdivididas em categorias, têm sido utilizadas para investigar a ocorrência de crimes na esfera criminalística. Dentre elas, é possível destacar as seguintes esferas forenses (CALAZANS; CALAZANS, 2005; INMAN; RUDIN, 2000): toxicologia, balística, patologia, entomologia, psiquiatria, odontologia, antropologia, DNA ou genética.

O DNA forense, também conhecido como genética forense merece destaque dentre estas subcategorias. Esta divisão procura encontrar variações ao nível de DNA para garantir a investigação correta de uma amostra biológica coletada durante uma investigação criminal (CHAKRABORTY; DEKA, 2019). Neste contexto, o conhecimento com relação as estruturas genéticas associadas as técnicas de biologia molecular são essenciais (DECANINE, 2016).

3 | TÉCNICAS E MARCADORES MOLECULARES

O DNA foi descoberto pelo bioquímico alemão Frederich Miescher no ano de 1869 e sua estrutura de dupla hélice foi originalmente descoberta por Rosalind Franklin. No ano de 1953, James Watson, Francis Crick e Maurice Wilkins mostraram o funcionamento e estrutura da dupla hélice, os mesmos foram laureados com o prêmio Nobel de Medicina em

1962. Basicamente, o DNA é composto de nucleotídeos, o qual possui grupos fosfatos ligados quimicamente a um açúcar (tipicamente a desoxirribose) e uma base nitrogenada. Os quatro tipos de bases são: Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) e Citosina (C) (ALBERTS *et al.*, 2010).

Neste sentido, o material genético presente nas matrizes biológicas encontrados em cenas de crimes podem desempenhar um papel fundamental na solução de um crime. Esse processo pode ser chamado de DNA *fingerprinting* (impressão digital do DNA), neste contexto, regiões hipervariáveis com sequência nucleotídica repetitivas, denominadas repetições curtas em tandem (RCT) e minissatélites, são comparados entre pessoas (BURG *et al.*, 2011).

As RCTs, também chamadas de microssatélites, são regiões de DNA repetitivas com cerca de um a seis pares de bases repetidos entre 5 a 50 vezes. Este fenômeno ocorre em milhares de locais dentro do genoma humano com taxas de mutação mais elevadas, gerando alta variabilidade gênica. Desta maneira, esta região é amplamente utilizada no diagnóstico de alguns tipos de câncer, testes de paternidade e também nas análises forenses. Os minissatélites são semelhantes aos microssatélites. Estas regiões também possuem uma sequência de DNA repetitivo, porém variando em comprimento de 10 a 60 pares de repetidos diversas vezes que não codificam nenhuma proteína. Além disso, os minissatélites também ocorrem em diversos locais no genoma humano com elevada variabilidade e mutabilidade (ALBERTS *et al.*, 2010; NUSSBAUM, 2008).

Devido a alta variabilidade dessas regiões, a frequência desses alelos pode ser calculada para atestar o princípio da individualidade. Desta maneira, a aplicação da técnica chamada de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *Polimerase chain reaction*), que multiplica estas regiões contendo pares de bases nitrogenadas repetidas pode ser extremamente útil na investigação forense de crimes, incluindo aqueles de natureza sexual (NUSSBAUM, 2008). Deste modo, pode se dizer que as análises forenses baseadas na técnica de PCR revolucionaram o sistema de justiça criminal. Os métodos atuais de DNA são capazes de produzirem resultados altamente confiáveis devido à sua sensibilidade, especificidade, robustez e poder de discriminação (JOHNSON *et al.*, 2012). Sendo assim, o DNA tem sido utilizado tanto na esfera criminal para identificar criminosos, como na esfera civil para a realização de testes de paternidade (DOLINSKY; PEREIRA, 2007).

A técnica de PCR é usada para amplificar os micro e minissatélite presentes em regiões específicas do DNA. Desta maneira os tamanhos dos fragmentos bem como os alelos presentes indicarão a similaridade do DNA da amostra com o DNA do suspeito. Como esta técnica é capaz de multiplicar pequenos fragmentos, apenas uma pequena quantidade de amostra é necessária para a análise. Desta maneira, fio de cabelo, alguns espermatozoides ou células epiteliais da pele sob as unhas da vítima podem fornecer DNA suficiente para uma análise conclusiva (BURG *et al.*, 2011; DOLINSKY; PEREIRA, 2007).

A metodologia de PCR se baseia na exposição do DNA a alguns reagentes (primers

e enzimas) mediante a ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento. Os primers são oligonucleotídeos de fita simples complementar à região de DNA alvo. A DNA polimerase é a enzima (originalmente isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*) capaz de catalisar a reação genética a fim de produzir diversas cópias do DNA da amostra. Na primeira etapa, as duas fitas da dupla hélice do DNA são desnaturadas mediante a aplicação de alta temperatura. Em seguida, a temperatura é diminuída e os primers se ligam às sequências complementares de DNA. As duas fitas de DNA tornam-se modelos para a DNA polimerase que compõem uma nova fita de DNA a partir de nucleotídeos livres. À medida que a reação avança, o próprio DNA gerado é usado como molde para a replicação, iniciando uma reação em cadeia na qual o molde original do DNA é amplificado exponencialmente (ZAHA *et al.*, 2014).

Técnica de PCR possui diversas vantagens. Dentre elas, é possível citar principalmente: a praticidade do método, a rapidez, alta sensibilidade e a capacidade de produzir milhões de cópias de uma pequena quantidade de amostra. Entretanto, a técnica também possui algumas limitações. Na maioria dos casos, é necessário saber a fonte da amostra a fim de conhecer a sequência de *primers* a ser inserida para iniciar a reação em cadeia. Além disso, a principal desvantagem da PCR é que mesmo a menor quantidade de DNA contaminante pode ser amplificada, resultando em resultados falsos. Nestes casos, o material genético pode ter sido depositado em circunstâncias inocentes, horas ou dias antes do crime. Deste modo, a coleta de evidências físicas de agressão sexual por equipes de saúde precisa ocorrer de maneira cautelosa, preservando as evidências potenciais associadas à vítima do abuso sexual (BURG *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2012).

4 | ABUSO SEXUAL

O abuso é definido pela atividade sexual sem consentimento. Esta definição pode ser estendida para casos em que a vítima também não está preparada ou não tem capacidade para compreender o desenvolvimento da relação. Este tipo de abuso pode ainda ser dividida em diferentes categorias: (ARAUJO, 2002).

- Pedofilia (quando a estimulação sexual de uma criança é feita por um adulto ou adolescente mais velho)
- Violência doméstica (quando o abuso ocorre entre cônjugues)
- Assédio (em casos em que a vítima é tocada sem o consentimento)
- Estupro (Quando ocorre o ato sexual sem consentimento da vítima)

Nestas situações, mesmo sem a presença de lesões físicas, estas situações podem levar sequelas a saúde mental do paciente. Em alguns casos, os pacientes podem ainda apresentar estresse pós traumático, gravidez indesejada e até mesmo o aparecimento de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs). Deste modo, os cenários de abuso sexual

constituem em um problema de saúde pública, acarretando até mesmo em prejuízos econômicos quando avaliado também a produtividade e perda de qualidade de vida de um indivíduo (FAÚNDES *et al.*, 2006).

Uma pesquisa realizada pelas Organizações das nações unidas mostrou que mais de 250.000 estupros ou tentativas de estupro foram registradas nos boletins policiais de 65 países no mundo todo (OMS, 2020). Entretanto, esta estimativa ainda pode estar muito subestimada devido a maioria das vítimas de estupro não reportarem os casos as autoridades competentes. Neste contexto, a violência sexual contra a mulher se baseia no desequilíbrio de poder existente entre homens e mulheres, ao redor do mundo. Além disso, a maior parte dos serviços de emergência não estão preparados para prestar atendimento adequado (FAÚNDES *et al.*, 2006).

Nos Estados Unidos, a RAINN (Rede nacional de estupro, abuso e incesto, do inglês, *Rape, Abuse & Incest National Network*), mostrou que em menos de 80 segundos, um americano é vítima de abuso sexual, uma média de mais de 400.000 abusos no período de um ano. No Brasil, o fórum brasileiro de segurança pública avaliou durante os anos de 2011 a 2014 as notificações de estupro no país. A pesquisa verificou que quase 70% das vítimas eram crianças e que 40% dos estupradores tinham parentesco direto com as vítimas. Os dados também mostraram que 10% dos abusados sofriam algum tipo de deficiência, além de registrar um aumento significativa da frequência de estupros coletivos, principalmente quando os abusadores eram desconhecidos das vítimas.

O código penal brasileiro traz em seu artigo. 213 as leis com relação ao estupro. “constranger alguém, mediante violência ou grave ameaça, a ter conjunção carnal ou a praticar ou permitir que com ele se pratique outro ato libidinoso”. Nestes casos a pena é de reclusão, de seis a dez anos. Se da conduta resulta lesão corporal de natureza grave ou se a vítima é menor de 18 a pena é de reclusão de oito a doze anos. Se da conduta resulta morte: a pena é de reclusão, de doze a trinta anos (BRASIL, 2009). Neste contexto, é necessário fazer com que a aplicação da lei seja cumprida mediante a comprovação do ato libidinoso através de provas cabais do acontecimento. Deste modo, a aplicação do DNA forense pode ser uma técnica valiosa na comprovação científica com alto grau de acurácia.

5 | APLICAÇÃO DA GENÉTICA FORENSE NA INVESTIGAÇÃO DOS CRIMES SEXUAIS

O uso do DNA para invesgar crimes sexuais tem como objetivos detectar, recuperar e caracterizar as evidências físicas e fornecer informações sobre o crime aos investigadores. As evidências podem estabelecer os elementos do crime, reconstruir a sequência de eventos, estabelecer as identidades da vítima e do agressor ou até mesmo atestar o álibi de um potencial suspeito. Dentre as fontes de material genético mais encontradas é possível citar principalmente: sangue, saliva, pelos, cabelos, unhas e sêmen (MAGALHÃES *et al.*, 2015;

NEWTON, 2013).

Além disso, uma grande vantagem da aplicação do DNA forense na investigação de crimes de natureza sexual é a possibilidade de se separar o DNA espermático de outros fluidos biológico, praticamente excluindo uma grande limitação de especificidade da técnica de PCR. Nesta situação, o DNA não-espermático pode ser separado da amostra através da técnica de lise diferencial de membranas, permitindo a individualização da fonte do sêmen. Nesta ocasião, os peritos fazem o uso primeiramente de uma substância com propriedades detergentes fracas para remover o DNA das células epiteliais e em seguida com uma substância com potencial de lise mais elevado, para que só e então seja liberado o DNA proveniente das células espermáticas (DAVIES, 1982; GARVIN *et al.*, 2009).

GOLDING *et al.* (2000) realizaram dois experimentos investigando o impacto do exame confirmativo de DNA envolvendo um caso hipotético de uma criança de 6 anos de idade. Em um primeiro cenário, os participantes leram resumos de julgamentos criminais de casos nos quais: (I) apenas evidências de DNA foram apresentadas, (II) apenas o depoimento da suposta criança vítima foi apresentado ou (III) ambas as formas de evidência foram apresentadas. Como resultados, quando as provas de DNA foram apresentadas, houve mais vereditos de culpa associado a maior crença vítima quando comparado apenas com somente o testemunho. Em um segundo cenário, além das provas, estava também o testemunho de um terceiro que garantiria o álibi do acusado no momento da alegada agressão. Nesta situação, o testemunho reduziu a influência das evidências de DNA em comparação com quando as evidências de DNA foram apresentadas sem esta testemunha. Estes resultados demonstram o peso comparativo de uma amostra positiva quando comparada somente ao testemunho da vítima.

Ingemann-Hansen *et al.* (2008) realizaram uma pesquisa com 307 vítimas de violência sexual na Dinamarca no período de 1999 até 2004. A disposição legal foi apurada e relacionada às características da vítima e da agressão, juntamente com os laudos médicos forenses e laboratoriais. A polícia apresentou acusações em mais da metade dos casos em que 11% eram acusações falsas. Nesta ocasião, apenas 19% de todos os casos terminaram com a sentença do réu mesmo com o DNA espermático detectado em 35% dos casos. Neste contexto, as informações do relatório forense sobre a detecção de esperma não ajudaram no julgamento do caso.

Um estudo em grande escala realizado por Gingras *et al.*, (2009), avaliou mais de mil casos de agressão sexual a fim de verificar a probabilidade de obter evidências de DNA de boa qualidade. Neste contexto, os autores demonstraram que cerca de 50% dos casos apresentavam prova genética mas que apenas 30% forneceram evidências de qualidade.

Thackeray *et al.*, (2011) reavaliam as recomendações com relação ao momento da coleta de evidências em casos de agressão sexual infantil. Os autores fizeram uma revisão retrospectiva dos prontuários médicos e legais de pacientes com idade entre 0 e 20 anos que necessitaram de coleta de evidências forenses por suspeita de abuso sexual. Como

resultados, 25 % dos kits testados foram positivos e 65% produziram DNA identificável. Neste contexto, os resultados demonstraram que na maioria dos casos em que a amostra foi colhida com um intervalo menor que 24 horas, ainda foi possível realizar a identificação do suspeito, entretanto, em períodos prolongados essa identificação se tornou um pouco mais difícil.

Rocha *et al.* (2013) realizaram um estudo de caso com o objetivo de demonstrar a importância da coleta de material peniano dos suspeitos em casos de crime sexual. Os autores avaliaram um caso de estupro de uma criança autista de 11 anos de idade. Os pesquisadores coletaram a amostra do abusador e da vítima com o auxílio de swabs para a determinação do DNA. Nesta situação, na amostra anal da vítima não foi possível detectar o material genético do acusado, todavia, na amostra colhida com swab peniano do acusado, foi constatada presença de perfil genético da vítima. Entretanto, vale a pena ressaltar que no sistema judiciário brasileiro, a amostra genética do abusador nem sempre é concebida devido a lei que não obriga o réu a produzir provas contra si mesmo que está contida no artigo 14 do pacto internacional sobre os direitos civis.

Campbell; Fehler-Cabral (2018) realizaram um trabalho utilizando a teoria das preocupações focais com a finalidade de entender por que as amostras de DNA coletadas no local do crime não são utilizadas em corte. Os autores avaliaram por três anos milhares de testes de DNA coletados entre 1980 e 2009 na cidade de Detroit, no estado de Michigan, que nunca tiveram seus resultados avaliados. Baseando-se em dados de observação, entrevista e arquivo, os autores destacaram que embora as preocupações práticas em relação aos recursos disponíveis para análise forense fossem claramente um fator determinante, já que Detroit não tinha financiamento ou pessoal capacitado para testar todos os kits, preocupações focais em relação à credibilidade da vítima foram mais influentes. Deste modo, os resultados dessa pesquisa podem ser atribuídos a uma cultura que costuma atribuir a culpa do estupro a uma característica da vítima e não ao comportamento agressivo do abusador.

Um estudo realizado por Davis; Wells (2019) avaliaram 1.200 casos arquivados de agressão sexual na cidade de Denver, no estado americano de Colorado, a fim de determinar a taxa de processos judiciais bem-sucedidos em que havia provas genéticas e o custo por condenação. Os autores perceberam que quase 40% dos casos em que houve uma correspondência de DNA não resultaram em prisão, principalmente porque as vítimas não cooperaram ou porque seu depoimento foi considerado não confiável. Outros fatores que afetaram a condenação incluíram o contexto do crime, a disponibilidade da vítima e a capacidade do réu de montar uma defesa. Uma vez feita a prisão, no entanto, o índice de condenação ultrapassou 90%.

Pombo *et al.* (2020) mostrou que pode ocorrer a contaminação cruzada em um laboratório de ciências forenses. Os autores realizaram várias coletas utilizando um swab estéril em vários pontos do laboratório, antes e após o processo de limpeza. Neste contexto, os resultados gerados mostraram que mesmo após o procedimento de limpeza, ainda foi possível encontrar material genético nas dependências do laboratório. Nesta ocasião, os

resultados só foram satisfatórios após um segundo ciclo de limpeza.

6 | CONCLUSÕES

As ciências forenses, em especial a genética forense, tem se consolidado como uma excelente ferramenta na investigação de crimes sexuais. A busca por informações genéticas contidas nas regiões hipervariáveis do DNA da vítima e do acusado (contidas nas unhas, roupas ou fluidos biológicos) podem contribuir diretamente para a solução de uma investigação criminal. Entretanto, apesar de ser uma excelente fonte de provas, este tipo de tecnologia não vem sendo explorado em seu máximo, seja por limitações de recurso ou pela limitação do poder jurídico. Todavia, acredita-se que existe uma tendência crescente da utilização dessas estratégias, tanto na esfera civil como criminal.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D. *et al.* Biologia molecular da célula. **Artmed**, 2010.

ARAUJO, M. d. F. J. P. Violência e abuso sexual na família. **Psicologia em estudo** p. 3-11, 2002.

BRASIL. Lei nº 12.015, de 07 de agosto de 2009. Altera o Título VI da Parte Especial do Decreto-Lei no 2.848, de 7 de dezembro de 1940 - Código Penal, e o art. 1º da Lei no 8.072, de 25 de julho de 1990, que dispõe sobre os crimes hediondos, nos termos do inciso XLIII do art. 5º da Constituição Federal e revoga a Lei no 2.252, de 1º de julho de 1954, que trata de corrupção de menores. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/lei/l12015.htm>. Acesso em 21/09/09; 2010-

BURG, A.; KAHN, R.; WELCH, K. DNA testing of sexual assault evidence: the laboratory perspective. **J Forensic Nurs**, v. 7, n. 3, p. 145-152, 2011.

CALAZANS, C. H.; CALAZANS, S. M. J. X. I., Universidade Integrada, Santo Ângelo/RS. **Ciência forense: das origens à ciência forense computacional**. 2005.

CAMPBELL, R.; FEHLER-CABRAL, G. Why Police “Couldn’t or Wouldn’t” Submit Sexual Assault Kits for Forensic DNA Testing: A Focal Concerns Theory Analysis of Untested Rape Kits. **Law & Society Review** v. 52, n. 1, p. 73-105, 2018.

CHAKRABORTY, R.; DEKA, R. DNA Forensics: A Population Genetic and Biological **Anthropological Perspective**. 2019.

DAVIES, A. The Appearance and Grouping of Mixtures of Semen and Vaginal Material. **Medicine, Science and the Law**, v. 22, n. 1, p. 21-30, 1982/01/01 1982.

DAVIS, R. C.; WELLS, W. DNA testing in sexual assault cases: When do the benefits outweigh the costs? **Forensic Science International**, v. 299, p. 44-48, 2019/06/01/ 2019.

DECANINE, D. O papel de marcadores moleculares na genética forense. **Revista brasileira de criminalística**. v. 5, n. 2, p. 18-27, 2016.

DOLINSKY, L. C.; PEREIRA, L. J. S.. R. DNA forense. **Saúde e ambiente em Revista**. v. 2, n. 2, p. 11-22, 2007.

FAÚNDES, A.; ROSAS, C. F.; BEDONE, A. J.; OROZCO, L. T. Violência sexual: procedimentos indicados e seus resultados no atendimento de urgência de mulheres vítimas de estupro. **J Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**. v. 28, p. 126-135, 2006.

FÓRUM BRASILEIRO DE SEGURANÇA PÚBLICA. Estupro no Brasil: vítimas, autores, fatores situacionais e evolução das notificações no sistema de saúde entre 2011 e 2014. **Edição RBSP** v. 11, n. 1, 2017

GARVIN, A. M.; BOTTINELLI, M.; GOLA, M.; CONTI, A. *et al.* DNA Preparation from Sexual Assault Cases by Selective Degradation of Contaminating DNA from the Victim. **Forensic Science**, v. 54, n. 6, p. 1297-1303, 2009.

GINGRAS, F.; PAQUET, C.; BAZINET, M.; GRANGER, D. *et al.* Biological and DNA evidence in 1000 sexual assault cases. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 2, n. 1, p. 138-140, 2009.

GOLDING, J. M.; STEWART, T. L.; YOZWIAK, J. A.; DJADALI, Y. *et al.* The Impact of DNA Evidence in a Child Sexual Assault Trial. **Child maltreatment**. v. 5, n. 4, p. 373-383, 2000.

HOUCK, M. M.; SIEGEL, J. A. Fundamentals of forensic science. **Academic press**, 2009.

INGEMANN-HANSEN, O.; BRINK, O.; SABROE, S.; SØRENSEN, V. *et al.* Legal aspects of sexual violence--does forensic evidence make a difference? **Forensic Sci Int**, v. 180, n. 2-3, p. 98-104, 2008.

INMAN, K.; RUDIN, N. Principles and practice of criminalistics: the profession of forensic science. **CRC Press**, 2000.

JOHNSON, D.; PETERSON, J.; SOMMERS, I.; BASKIN, D. J. V. A. W. Use of forensic science in investigating crimes of sexual violence: Contrasting its theoretical potential with empirical realities. **Violence Against Women**. v. 18, n. 2, p. 193-222, 2012.

MAGALHÃES, T.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; SILVA, B.; CORTE-REAL, F. *et al.* Biological Evidence Management for DNA Analysis in Cases of Sexual Assault. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 365674, 2015.

NEWTON, M. The forensic aspects of sexual violence. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 27, n. 1, p. 77-90, 2013.

NUSSBAUM, R. Thompson & Thompson genética médica. **Elsevier**, 2008.

POMBO, A. M. L.; DA COSTA FRANCEZ, P. A.; SILVA, R. J. R. B. d. C. Risco de contaminação por DNA de alto peso molecular e por amplicons em Laboratório de Genética Forense no Brasil. **Revista Brasileira de Criminalística**. v. 9, n. 2, p. 85-94, 2020.

RAINN. Perpetrators of Sexual Violence: Statistics, 2020. Disponível em: <https://www.rainn.org/statistics/perpetrators-sexual-violence>. Acesso em: 05.09.2020

RIBAUX, O.; BAYLON, A.; ROUX, C.; DELÉMONT, O. *et al.* Intelligence-led crime scene processing. Part I: Forensic intelligence. **Forensic Science International**, v. 195, n. 1, p. 10-16, 2010.

ROCHA, T.; TORRES, J.; SOBREIRA, A.; BRASIL, S. *et al.* A importância da coleta de material peniano do suspeito em casos de crimes sexuais: um relato de caso. **Saúde, Ética & Justiça**. v. 18, p. 45-49, 2013.

OMS. "The Eighth United Nations Survey on Crime Trends and the Operations of Criminal Justice Systems (2001 - 2002), 2020 Disponível em: <https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/Eighth-United-Nations-Survey-on-Crime-Trends-and-the-Operations-of-Criminal-Justice-Systems.html> Acesso em: 05.09.2020.

THACKERAY, J. D.; HORNOR, G.; BENZINGER, E. A.; SCRIBANO, P. V. Forensic Evidence Collection and DNA Identification in Acute Child Sexual Assault. **Pediatrics** v. 128, n. 2, p. 227-232, 2011.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. Biologia Molecular Básica-5. **ARTMED**, 2014.

O IMPACTO DA MEDICINA PERSONALIZADA NO SETOR DA SAÚDE

Data de aceite: 01/10/2021

Benedito R. da Silva Neto

Pós-Doutor em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática.

Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública pela Universidade Federal de Goiás. Mestre em Biologia Celular e Molecular. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP/UFG

RESUMO: A definição de medicina personalizada se baseia naquilo que podemos chamar de customização do tratamento médico, objetivando categorizar indivíduos em subpopulações baseadas tanto na diferença da resposta a um tratamento específico quanto na susceptibilidade a uma determinada doença. Nos últimos anos esse novo conceito sobre a forma de diagnóstico e tratamento tem sido amplamente discutido principalmente pelo advento da biologia molecular e das ferramentas biotecnológicas. São inúmeras as estratégias passíveis de serem utilizadas com o objetivo de caracterizar informações genéticas de indivíduos, famílias e populações, tais como os diversos testes genéticos, biossensores inteligência artificial, terapias celulares/gênicas, e mais recentemente o CRISPR. Atualmente já é possível mensurar os pontos positivos e também vislumbrar novas possibilidades para o tratamento de diversas doenças, todavia várias incertezas se tornam em desafios para seu uso coletivo, desde o contexto financeiro ao bioético. A partir deste material pretendemos adentrar no contexto

da medicina personalizada abrindo caminho para futuros capítulos e novas discussões sobre sua eficácia, importância, eficiência, e impactos nos custos e nos sistemas de saúde.

PALAVRAS-CHAVE: Saúde; medicina personalizada; genômica; desafios.

THE IMPACT OF CUSTOMIZED MEDICINE ON THE HEALTH SECTOR

ABSTRACT: The definition of personalized medicine is based on what we might call the customization of medical treatment, aiming to categorize individuals into subpopulations based both on the difference in response to a specific treatment and on their susceptibility to a particular disease. In recent years, this new concept of diagnosis and treatment has been widely discussed, mainly due to the advent of molecular biology and biotechnological tools. There are countless strategies that can be used in order to characterize genetic information from individuals, families and populations, such as the various genetic tests, artificial intelligence biosensors, cell/gene therapies, and more recently, CRISPR. It is currently possible to measure the positive points and also glimpse new possibilities for the treatment of various diseases, however, several uncertainties become challenges for its collective use, from the financial to the bioethical context. From this material, we intend to enter the context of personalized medicine, opening the way for future chapters and new discussions about its effectiveness, importance, efficiency, and impacts on costs and on health systems.

KEYWORDS: Health; personalized medicine;

genomics; challenges.

1 | INTRODUÇÃO

Temos observado recentemente a evolução do campo médico de forma pessoal e contemporânea, poderíamos dizer que quase que em tempo real, já que as facilidades dos novos sistemas de comunicação permitem a entrega rápida da informação e também porque os sistemas de análise e divulgação de dados científicos se adaptaram aos avanços tecnológicos permitindo a troca de informação entre os avaliadores, a facilidade na divulgação em plataformas on-line e principalmente o avanço das técnicas e equipamentos disponíveis.

Este conceito pode ser facilmente contextualizado quando observamos desenvolvimento de vacinas e de antibióticos, utilizando-se do aprimoramento de tecnologias que avançaram ao longo dos anos, por exemplo a vacina de mRNA já utilizada no combate ao avanço da pandemia de COVID-19 que até alguns anos atrás não passava de um vislumbre e hoje contribuem para uma nova era no campo das imunizações.

Dentre essas novas tecnologias disponíveis, que tem transformado o modo de se pensar em tratamento, estão as ferramentas que direcionam cada vez mais para um campo de tratamento particular para cada indivíduo e está relacionada à medicina personalizada já que esta modifica a forma de assistência à saúde, tornando o indivíduo o seu foco.

A Medicina Personalizada, também conhecida como Medicina de Precisão ou Medicina Individualizada, se baseia na utilização de informação biológica específica de cada indivíduo (comumente categorizamos esta no campo molecular, baseada no código genético informacional) para definir os medicamentos e/ou procedimentos clínicos que sejam mais precisos possíveis, no menor tempo possível e com a maior probabilidade e chance de sucesso possível.

Portanto, a medicina de personalizada diz respeito ao desenvolvimento de técnicas para a customização dos tratamentos de saúde levando em conta as particularidades genéticas de cada indivíduo e suas respostas tanto às enfermidades quanto aos tratamentos, levando em consideração também o meio ambiente e o estilo de vida de cada paciente.

DESENVOLVIMENTO

O *Projeto Genoma Humano*, finalizado em 2003 com um custo de pelo menos 3 mil milhões de dólares, mais de 10 anos de trabalho, e cerca de 5 mil cientistas de vários países, propôs o mapa detalhado do genoma humano. Deve-se destacar aqui que não apenas providenciou a gama de informações, que temos em mãos hoje, sobre a espécie humana, mas também otimizou equipamentos como sequenciadores automáticos que puderam também ser utilizados para avanços genômicos das mais variadas espécies do planeta. Assim, à medida

que a tecnologia de sequenciamento, a bioinformática e a capacidade de armazenamento de informações foram progredindo exponencialmente, de forma inversamente proporcional o preço e tempo necessários para ler o código genético foi diminuindo.

Mais recentemente, em 2015, o governo americano governado por Barack Obama lançou um programa de mais de US\$ 200 milhões (*Precision Medicine Initiative, National Institutes of Health*), com o principal objetivo de alavancar a medicina de personalizada e propor uma nova era no tratamento e diagnóstico de doenças.

Atualmente no Brasil o Programa Nacional de Genômica e Saúde de Precisão, batizado de Genomas Brasil, lançado no ano de 2020, tem como objetivo sequenciar genes de portadores de doenças raras, cardíacas, câncer e infectocontagiosas, tal como a COVID-19. A escolha das doenças foi baseada na quantidade de casos no país e o alto custo que geram ao Sistema Único de Saúde, segundo informou o Ministério da Saúde. O principal objetivo será mapear o genoma de 100 mil brasileiros, provendo um banco de dados sólido para pesquisas, implantação no SUS e fortalecimento da indústria da área personalizada no país.

Mas em que pese, o que é a medicina personalizada?

De acordo com a definição de 2008 do National Research Council, a medicina de personalizada se refere à customização de tratamento médico para a característica individual de cada paciente. Não se trata necessariamente da criação de novas drogas ou novos dispositivos médicos específicos de um único paciente, mas sim a uma determinada habilidade de classificar indivíduos em subpopulações que diferem na susceptibilidade a uma determinada doença assim como na resposta a um tratamento específico. Assim, a prevenção ou intervenção terapêutica poderá concentrar naqueles que de fato terão benefício, economizando gastos e diminuindo efeitos adversos naqueles que não terão benefícios com aquele determinado medicamento.

Precisamos reforçar que informações individuais como idade, histórico familiar e estilo de vida, de certo modo a muito tempo já são utilizados na medicina todavia há um novo conceito implícito quando falamos de medicina personalizada, e exatamente por isso abordamos aqui a importância dos avanços genômicos, pois a disponibilidade de informação sobre o perfil genético do indivíduo e conseqüentemente como ele se relaciona com determinadas doenças nos revela o que há de mais importante quando se busca efetividade no tratamento, as características presentes no DNA do indivíduo e que em determinado instante serão expressas.

Um dos grandes motivos para o avanço na área da medicina personalizada foi a acessibilidade em valores financeiros das análises que podem ser realizadas com material genético. Segundo publicação recente do *Massachusetts Institute of Technology (MIT)*, entre 2001 e 2017, o custo para o sequenciamento de um genoma passou de mais de US\$ 95 milhões para pouco mais de US\$ 1.000, uma redução extremamente considerável. Deste modo, o número de consumidores de testes em todo o mundo aumentou exponencialmente, tanto pelo lado da busca por respostas às causas de doenças, quanto pelo uso comercial

para genealogias, estudos populacionais etc. Finalmente, a comunidade científica como um todo acaba por possuir novas possibilidades de responder às demandas como “que tipo de gene está relacionado com o aparecimento de determinada doença” e assim por diante.

Outro fator fundamental a ser destacado aqui é importância da conexão de dois campos: a Biologia e a Informática. A bioinformática exatamente essa área multidisciplinar que reúne genética, ciência da computação, matemática e estatística, podendo ser entendida como a ciência de dados voltada para solucionar problemas biológicos. As técnicas genômicas tem a capacidade de gerar uma quantidade muito significativa de dados, estes por sua vez precisam ser armazenados, organizados e comparados com padrões para possibilitar a interpretação mais fiel possível dos resultados, conseqüentemente ferramentas de bioinformática se tornam fundamentais nesse processo, pois permitem que todas essas informações gênicas e suas variações possam ser analisadas e interpretadas.

Dentro do conceito de medicina de precisão podemos encontrar na literatura algumas tecnologias que são primordiais tais como os testes genéticos, sensores para monitorar pacientes, inteligência artificial, terapias celulares e gênicas (destacando a mais recente e promissora ferramenta de edição gênica, vencedora do Prêmio Nobel de 2020: CRISPR).

A possibilidade de entrega do tratamento correto para a pessoa certa no momento certo poderá melhorar a qualidade do tratamento além de reduzir custos com tratamentos ineficazes. O custo dos exames genéticos e, principalmente, das terapias celulares e gênicas ainda é alto, todavia, a medicina personalizada tem o potencial de aprimorar e diminuir seu custo-efetividade relativo, haja vista que as tecnologias citadas aqui ainda estão em desenvolvimento. Assim temos, de um lado, um diagnóstico mais preciso e um tratamento mais adequado ao perfil genético que podem resultar em maior efetividade e menor desperdício. Do outro lado, sabemos que todos os testes moleculares e genéticos ainda são mais caros do que os convencionais, contudo um dos mecanismos atuais amplamente estudados para remediar esse contraponto tem sido a utilização de *big data*, inteligência artificial e dispositivos de monitoramento da saúde das pessoas que necessariamente são bem mais baratos.

CONCLUSÃO

Finalmente, é importante destacar que outras variáveis ainda tem sido discutidas e consideradas no aspecto da implementação da medicina personalizada, como a possibilidade de se formar nichos de mercado menores, atendidos por apenas uma ou poucas empresas com maior poder de mercado que conseqüentemente pode alterar a concorrência no setor farmacêutico, e a própria questão bioética em se ofertar tratamentos mais eficientes apenas à uma determinada parcela da população que tenha condição financeira, ou até mesmo a possibilidade de bancos dados genômicos serem oferecidos ou adquiridos por empresas para seleção de funcionários, ou até para planos de saúde tabelarem seus valores. Ainda

temos um caminho árduo a ser percorrido, fomentando expectativas de soluções médias para a humanidade e ao mesmo tempo atentando para os desafios éticos, assim pretendemos fomentar esse assunto em futuros capítulos em obras do campo da genética e da medicina para elucidar também a medicina personalizada no Sistema Único de Saúde e o futuro dos testes genéticos, a genômica na saúde de precisão em tempos de pandemia e os desafios atuais da medicina genômica.

REFERÊNCIAS

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de regularização de produtos para diagnóstico *in vitro* na ANVISA. Brasília: Anvisa, 2015.

ARONSON, S. J.; REHM, H. L. Building the foundation for genomics in precision medicine. *Nature*, v. 526, n. 7573, p. 336-342, 2015.

BRASIL. Lei no 12.401, de 28 de abril de 2011. Altera a Lei no 8.080, de 19 de setembro de 1990, para dispor sobre a assistência terapêutica e a incorporação de tecnologia em saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS. Diário Oficial da União, Brasília, 29 abr. 2011.

OECD – ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Health at a glance 2019: OECD Indicators. Paris: OECD, 2019. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/social-issues-migration-health/health-at-a-glance_19991312>. Acesso em: 9 jun. 2019.

SPEAR, B.B. *et al.* *Clinical application of pharmacogenetics*, *Trends in Molecular Medicine*, 7(5): 201-204. 2001.

KONGKAEW, C. *et al.* *Hospital admissions associated with adverse drug reactions: A systematic review of prospective observational studies*, *Annals of Pharmacotherapy*, 42(7): 1017-1025. 2008.

PHILLIPS, K.A. *et al.* *Potential Role of Pharmacogenomics in Reducing Adverse Drug Reactions: A Systematic Review*, *JAMA*, 286(18): 2270-2279. 2001.

The Personalized Medicine Report, *Personalized Medicine Coalition*, acesso em 28 de agosto de 2021.

The International Consortium for Personalised Medicine, acesso em 25 de setembro de 2021.

The Precision Medicine Initiative, acesso em 22 de setembro de 2021.

The 100,000 Genomes Project, acesso em 10 de setembro de 2021.

SWEENEY, K. Technology trends in drug discovery and development: implications for the development of the pharmaceutical industry in Australia. Melbourne: Victoria University of Technology, 2002. (Working Paper, n. 3).

VAYENA, E. *et al.* Policy implications of big data in the health sector. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 96, n. 1, p. 66-68, 1 dez. 2018.

SOBRE O ORGANIZADOR

DR. BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (2005), com especialização na modalidade médica em Análises Clínicas e Microbiologia (Universidade Candido Mendes - RJ). Em 2006 se especializou em Educação no Instituto Araguaia de Pós graduação Pesquisa e Extensão. Obteve seu Mestrado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto de Ciências Biológicas (2009) e o Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (2013) da Universidade Federal de Goiás. Pós-Doutorado em Genética Molecular com concentração em Proteômica e Bioinformática (2014). O segundo Pós doutoramento foi realizado pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Aplicadas a Produtos para a Saúde da Universidade Estadual de Goiás (2015), trabalhando com o projeto Análise Global da Genômica Funcional do Fungo *Trichoderma Harzianum* e período de aperfeiçoamento no Institute of Transfusion Medicine at the Hospital Universitätsklinikum Essen, Germany. Seu terceiro Pós-Doutorado foi concluído em 2018 na linha de bioinformática aplicada à descoberta de novos agentes antifúngicos para fungos patogênicos de interesse médico.

Palestrante internacional com experiência nas áreas de Genética e Biologia Molecular aplicada à Microbiologia, atuando principalmente com os seguintes temas: Micologia Médica, Biotecnologia, Bioinformática Estrutural e Funcional, Proteômica, Bioquímica, interação Patógeno-Hospedeiro.

Sócio fundador da Sociedade Brasileira de Ciências aplicadas à Saúde (SBCSaúde) onde exerce o cargo de Diretor Executivo, e idealizador do projeto “Congresso Nacional Multidisciplinar da Saúde” (CoNMSaúde) realizado anualmente, desde 2016, no centro-oeste do país.

Atua como Pesquisador consultor da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás - FAPEG. Atuou como Professor Doutor de Tutoria e Habilidades Profissionais da Faculdade de Medicina Alfredo Nasser (FAMED-UNIFAN); Microbiologia, Biotecnologia, Fisiologia Humana, Biologia Celular, Biologia Molecular, Micologia e Bacteriologia nos cursos de Biomedicina, Fisioterapia e Enfermagem na Sociedade Goiana de Educação e Cultura (Faculdade Padrão). Professor substituto de Microbiologia/Micologia junto ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia, Imunologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. Coordenador do curso de Especialização em Medicina Genômica e Coordenador do curso de Biotecnologia e Inovações em Saúde no Instituto Nacional de Cursos. Atualmente o autor tem se dedicado à medicina tropical desenvolvendo estudos na área da micologia médica com publicações relevantes em periódicos nacionais e internacionais. Contato: dr.neto@ufg.br ou neto@doctor.com

ÍNDICE REMISSIVO

A

Aconselhamento genético 4, 5, 1, 3, 9, 10, 11

Anomalias cromossômicas 1, 2, 3, 6, 7

B

BDNF 5, 41, 42, 43, 44, 45, 46

C

Ciências forenses 5, 13, 14, 18, 58, 59, 60, 65, 66

D

Delitos sexuais 58

Desafios 29, 69, 73

DNA 4, 6, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 31, 40, 41, 42, 44, 47, 48, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 71

DNA repair genes 6, 47, 48, 49, 53, 54, 55

Doença falciforme 5, 41, 43, 44, 45

F

Fibrose cística 5, 3, 28, 29, 31, 38, 39, 40

G

Genética 2, 4, 5, 6, 1, 3, 5, 9, 10, 11, 13, 14, 17, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 32, 36, 37, 38, 40, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 73, 74

Genética molecular 2, 4, 5, 13, 14, 22, 40, 69, 74

Genômica 69, 73

I

ICSI 5, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10

Infertilidade masculina 5, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 34

L

LIG4 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 57

M

Medicina personalizada 6, 69, 70, 71, 72, 73

P

PCR 15, 16, 17, 21, 26, 41, 42, 44, 46, 50, 58, 59, 61, 62, 64

Polimorfismo 5, 19, 41, 43, 44

Proteína CFTR 29, 33

S

Saúde 69, 70, 72, 73

SNPs 13, 20, 21, 22, 23, 26, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 54

Systemic Lupus Erythematosus 6, 47, 48, 52, 53, 55, 56, 57

T

Técnicas moleculares 13, 14, 58, 60

Terapia alvo 29

V

Val66Met 5, 41, 42, 43, 44, 45, 46

GENÉTICA:

Molecular, humana e médica

2

-  www.atenaeditora.com.br
-  contato@atenaeditora.com.br
-  [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)
-  www.facebook.com/atenaeditora.com.br

GENÉTICA:

Molecular, humana e médica

2



www.atenaeditora.com.br



contato@atenaeditora.com.br



[@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)



www.facebook.com/atenaeditora.com.br