



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

**MARCADORES MOLECULARES: APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO
HUMANA E PROSPECÇÃO NO CÂNCER CERVICAL**

MAREK HENRYQUE FERREIRA EKERT

Fevereiro, 2017

Recife-PE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO-ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

MAREK HENRYQUE FERREIRA EKERT

***MARCADORES MOLECULARES: APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA
E PROSPECÇÃO NO CÂNCER CERVICAL***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Doutorando: Marek Henryque Ferreira Ekert
Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Coorientadora: Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Fevereiro, 2017
Recife – PE

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Ekert, Marek Henryque Ferreira

Marcadores moleculares: aplicação na identificação humana e prospecção na infecção por HPV / Marek Henryque Ferreira Ekert- Recife: O Autor, 2017.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.

Inclui referências e apêndices

1. Colo uterino- câncer 2. Papilomavírus 3. Biologia molecular I. Lima Filho, José Luiz de (orientador) II. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (coorientadora) III. Título

616.94466

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-226

BANCA EXAMINADORA

Parecer da comissão examinadora da defesa de doutorado de

Marek Henryque Ferreira Ekert

MARCADORES MOLECULARES: APLICAÇÃO NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA E PROSPECÇÃO NA INFECÇÃO POR HPV

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro,
considera o candidato Marek Henryque Ferreira Ekert

APROVADO

Recife, 06 de fevereiro de 2017.

PRESIDENTE (orientador): Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Coorientador(a): Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Fabrício Oliveira Couto

Núcleo de Ciências da Vida da Universidade Federal de Pernambuco (CAA)

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Sandra Maria Santos

Gerente Geral de Polícia Científica de Pernambuco

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Gustavo Alves do Nascimento

Núcleo de Ciências da Vida da Universidade Federal de Pernambuco (CAA)

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO (suplente): Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO (suplente): Dra. Danielly Santos Campos Ferreira

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

*Dedico esta tese à minha família: Camila
Danielle Lopes Pedro (esposa), Solange
Ferreira de Barros (mãe), Marek Ekert
(pai) e Agnieszka Adrieny Ferreira Ekert
(irmã).*

“O difícil se faz agora, o impossível leva um pouco mais de tempo”.

David Ben-Gurion.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela paz, tranquilidade e serenidade nos momentos necessários.

Ao amor da minha vida, minha esposa Camila Lopes, por simplesmente me dar todo o suporte e serenidade, além de me fazer o homem mais feliz do mundo. Uma mulher que esperei por 28 anos e graças às diversas obras divinas e do destino, foi colocada em minha vida e nunca mais sairá.

À minha mãe, Solange Ferreira de Barros, pela segurança passada nas horas de incertezas, perseverança, me fazendo acreditar que tudo vai dar certo, conversas diárias, brincadeiras e amor. Uma mulher única e insubstituível.

Ao meu Pai, Marek Ekert, por acreditar que o filho é motivo de orgulho e pelo ensinamento, entre muitos outros, de que a tônica do sucesso se faz através da humildade e da competência.

À minha irmã, Agnieszka Adrieny Ferreira Ekert, por sempre acreditar em mim e torcer pelo meu sucesso.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pelas oportunidades e incentivo profissional em todos os momentos. Uma pessoa extraordinária e, sinceramente, rara de se encontrar.

À minha coorientadora, Prof^a Dr^a Danyelly Bruneska, pela competência em transmitir com sabedoria os conhecimentos que fundamentaram esta tese, pelo estímulo e confiança depositados em mim e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos do Prospecmol e do LIKA: Henrique Castelletti, Kleiton Borges, Rodrigo Pimentel, Rafaella Nascimento e Natália Oliveira, pelo ótimo clima vivenciado diariamente e, por fazer do laboratório um ambiente não só para o trabalho, mas de aprendizagem para toda a vida.

Ao Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense da Polícia Científica de Pernambuco, especialmente aos Peritos Criminais: Dr. Carlos Souza e Dra. Sandra Santos, por todo o suporte.

À Perícia Oficial de Alagoas, por todo o suporte, consultoria e ensinamentos.

À instituição LIKA pela estrutura oferecida para o desenvolvimento das pesquisas.

Em especial às pacientes que cederam material biológico em prol da ciência.

Obrigado!

RESUMO

Atualmente o mercado global de marcadores moleculares está avaliado em US\$ 24.10 bilhões. Eles são ferramentas muito versáteis, utilizados na área forense e na medicina. Na identificação humana, o uso do DNA (marcadores STR) continua revolucionando as áreas jurídicas e criminais. Por outro lado, a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) ainda não possui marcadores precoces para diagnóstico. A resposta imune contra o HPV é caracterizada pela imunidade celular local e nesse processo, os receptores Toll-Like (TLRs) desempenham um papel importante na detecção de moléculas pertencentes à agentes microbianos, desencadeando cascatas imunológicas para ativar fatores de transcrição, como o IRF3 e conseqüentemente, a inflamação e resposta antiviral. O presente trabalho objetivou utilizar marcadores moleculares para identificação humana e selecionar possíveis biomarcadores para a infecção pelo HPV. Através dos marcadores STR, foi possível realizar, com êxito, a identificação de 125 vítimas de crimes no estado de Pernambuco. Ademais, mediante esses marcadores genéticos, elucidou-se um caso de homicídio, que gerou grande repercussão no estado de Alagoas, no qual identificou-se uma vítima de esquartejamento. O contexto social atual obriga por parte do governo, profissionais de segurança pública e cientistas, uma busca constante por alternativas e metodologias cada vez mais eficientes que permitam identificar criminalmente as vítimas e os autores dos ilícitos penais. A integridade genômica do TLR2 é importante para evitar a infecção pelo HPV, quando esta sinalização é previamente estimulada através de vaginose bacteriana. A população estudada não mostrou associação do polimorfismo S427T no gene IRF3 com susceptibilidade à infecção pelo HPV ou vaginose bacteriana. No entanto, estudos adicionais são necessários para explorar o papel dos polimorfismos das TLRs, principalmente a TLR2 e, também das moléculas de suas cascatas de ativação imunológica, especialmente o IRF3, no risco de infecção pelo HPV associado com níveis de citocinas e recrutamento celular imune neste tecido. Dessa forma, pode-se tentar elucidar o papel dessas moléculas na resposta imune contra HPV.

Palavras chave: Identificação humana. Marcadores STR. HPV. TLR2. IRF3.

ABSTRACT

Currently, the global market for molecular markers is valued at \$ 24.10 bln. They are very versatile tools, used in the forensic area and in medicine. In human identification, the use of DNA (STR markers) continues to revolutionize as legal and criminal areas. On the other hand, a Human Papillomavirus (HPV) infection does not yet have early markers for diagnosis. The response is similar to HPV and is characterized by local cellular immunity and by the process, Toll-Like receptors (TLRs) play an important role in detecting molecules belonging to microbial agents, triggering immunological cascades to activate transcription factors, such as IRF3 and Consequently, inflammation and antiviral response. The present work aimed to use molecular markers for human identification and to select possible biomarkers for an HPV infection. Through the STR markers, it was possible to successfully identify 125 victims of crimes in the state of Pernambuco. In addition, through these genetic markers, a case of homicide was elucidated, that generated great repercussion in the state of Alagoas, in which a victim of quartering was identified. The current social context, by the government, public security professionals and scientists, a constant search for alternatives and increasingly efficient methodologies that allow criminally identify as victims and perpetrators of criminal offenses. The genomic integrity of TLR2 is important to prevent HPV infection when it is estimated through the bacterial vaginosis. The studied population showed no association of the S427T polymorphism with any IRF3 gene with susceptibility to HPV infection or bacterial vaginosis. However, additional studies are needed to explore the role of TLR polymorphisms, especially a TLR2 and also the molecules of their immunological activation cascades, especially IRF3, no risk of HPV infection associated with cytokine levels and immune cell recruitment in this Tissue In this way, one can try to elucidate the role of theses molecules in the immune response against HPV.

Key words: Human identification. STR markers. HPV. TLR2. IRF3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 01 – Métodos de identificação humana.....	15
Figura 02 – Regiões minissatélites e microssatélites do DNA.....	17
Figura 03 – Árvore filogenética dos Papilomavírus.....	25
Figura 04 - Representação do mapa genômico do HPV 16.	27
Figura 05 – Diferentes graus de lesões cervicais de acordo com a colposcopia.....	28
Figura 06 - Esquema mostrando a evolução da infecção pelo Papilomavírus humano.....	31
Figura 07 – As diversas barreiras presentes no sistema imune inato.....	32

ARTIGO I

Figura 1 – Frequência dos crimes que acometeram as vítimas analisadas pelo LPPGF entre 2012 e 2014.....	50
--	----

ARTIGO III

Figure 1. Agarose gel electrophoresis showing patterns of TLR2 polymorphisms and sequence analysis.....	67
--	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – <i>Loci</i> recomendados pelo FBI para definição do perfil de DNA forense.....	20
Tabela 2 - Estimativa para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de casos novos por câncer, em mulheres, no Brasil.....	24

ARTIGO I

Tabela 1. Parâmetros analisados pelo LPPGF de acordo com os crimes ocorridos em Pernambuco entre 2012-2014.....	50
--	----

ARTIGO II

Tabela 1. Confronto dos alelos (24 loci STR) das amostras questionadas AQ1 (arco costal), AQ2 (úmero) e da amostra de referência AR (esfregaço buccal do suposto filho), estabelecendo a condição de inclusão de maternidade.....	55
--	----

ARTIGO III

Table 1. Polymorphic profile of TLR2 gene in cervical samples in women of Olinda – Brazil.....	68
Table 2. Association between Bacterial vaginosis, HPV and TLR2.....	69
Table 3. Association of TLR gene polymorphisms and TLR2 polymorphism.....	70

ARTIGO IV

Table 1. Association between SNP in IRF3 (S427T) and HPV infection.....	79
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTERPOL	Organização Internacional de Polícia Criminal
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfisms
HLA	Sistema de Histocompatibilidade Humana
SNP	Single Nucleotide Polymorfism
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
STR	Short Tandem Repeats
PCR	Polymerase Chain Reaction
FBI	Federal Bureau Investigation
ISFG	International Society for Forensic Genetics
CODIS	Combined DNA Index System
WHO	World Health Organization (OMS = Organização Mundial da Saúde)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
HPV	Human Papillomavirus (Papilomavírus humano)
ICTV	International Council on the Taxonomy of Viruses
ORF	Open Reading Frame (quadro de leitura aberta)
L	Gene que Codifica Proteína Tardia (Late)
E	Gene que Codifica Proteína Imediata (Early)
kD	Quilodaltons
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
TLRs	Toll-like Receptors (Receptores Toll-like)
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PRRs	Pattern Recognition Receptors
IRF3	Interferon Regulatoy Factor 3
HSP	Heat Shock Protein
BRCA1	Breast Cancer 1 – Early Onset

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 MARCADORES MOLECULARES	13
2.2 MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA	14
2.2.1 VNTRs (Variable Number Tandem Repeats)	17
2.2.2 STRs (Short Tandem Repeats)	18
2.3 MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER CERVICAL	23
2.3.1 O câncer cervical	23
2.3.2 HPV: genoma e infecção	24
2.3.3 Sistema imune inato e TLRs	31
2.3.4 Marcadores moleculares no Câncer	34
REFERÊNCIAS.....	36
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
ARTIGO I - DNA FORENSE APLICADO NA IDENTIFICAÇÃO DE VÍTIMAS DE CRIMES EM PERNAMBUCO, BRASIL.....	47
ARTIGO II - DNA FORENSE APLICADO NA IDENTIFICAÇÃO DE VÍTIMA DE ESQUARTEJAMENTO.....	52
ARTIGO III - ABSENCE OF POLYMORPHISM IN TLR2 GENE AS A PROTECT FACTOR AGAINST HPV INFECTION IN WOMEN WITH BACTERIAL VAGINOSIS.....	56
ARTIGO IV - EVALUATION OF IRF3 (S427T) POLYMORPHISM AND SUSCEPTIBILITY TO HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION.....	71
4 CONCLUSÕES.....	80
APÊNDICE A – ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR FOR BOVINE PAPILLOMAVIRUS DETECTION USING POLYMERIC FILM ON SCREEN- PRINTED ELECTRODE.....	81
APÊNDICE B – ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR FOR HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 DETECTION IN REAL SAMPLES.....	83
APÊNDICE C – DNA GENOTYPING ANALYSIS OVERVIEW: PROFILE OF RAPE CASES IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL.....	85

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o mercado global de marcadores moleculares está avaliado em US\$ 24.10 bilhões e estima-se que deverá alcançar US\$ 45,55 bilhões em 2020. Esses marcadores podem ser usados para vários propósitos nas mais diversas áreas do conhecimento, com aplicações biotecnológicas na agricultura, no meio ambiente e principalmente na medicina (detecção e acompanhamento de doenças, como o câncer) e na área forense (identificação humana).

Na identificação humana, o uso do DNA (regiões STR) é, na atualidade, considerada importantíssima para a resolução de situações que envolvam questões criminais, bem como aquelas relacionadas a paternidade. O uso destes marcadores continua revolucionando as áreas jurídicas e criminais.

Por outro lado, em doenças como o câncer, os marcadores moleculares voltados ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica já estão disponíveis comercialmente. No entanto, ainda há alguns tipos de câncer que não têm os marcadores moleculares caracterizados. O câncer cervical é causado pelo Papilomavírus Humano (HPV), que burla o sistema imunológico, e permanece latente na maioria das mulheres infectadas. A resposta imune contra o HPV é caracterizada pela imunidade celular local e pela produção de anticorpos neutralizantes que estão associados com a regressão da lesão e a proteção contra o mesmo tipo do vírus, respectivamente.

Nesse processo, os receptores Toll-Like (TLRs) desempenham um papel importante na detecção de moléculas pertencentes a agentes microbianos, desencadeando cascatas imunológicas para ativar a inflamação e resposta antiviral.

Desta forma, tendo em vista a importância social do tema, a presente tese buscou aplicar marcadores moleculares humanos para identificação forense de amostras oriundas de local de crime além de prospectar possíveis marcadores moleculares para o diagnóstico e/ou prognóstico do câncer cervical.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – MARCADORES MOLECULARES

Marcador molecular é um tipo de biomarcador e, em sentido amplo, é definido como qualquer ferramenta capaz de ser alvo de detecção de alguma condição biológica (Chen et al., 2017). Esses marcadores podem ter qualquer natureza biológica: proteínas, carboidratos, lipídeos, aminoácidos, enzimas, taninos, anticorpos, receptores de membrana, microRNAs ou mutações genéticas no DNA.

Essas moléculas podem ser usadas para vários propósitos nas mais diversas áreas do conhecimento, com aplicações biotecnológicas na agricultura, no meio ambiente e principalmente na medicina (Chen et al., 2017) (detecção e acompanhamento de doenças, como o câncer) e na área forense (identificação humana). Tais aplicações geram um campo muito atrativo para a prospecção de conhecimento e recursos.

Atualmente o mercado global de marcadores moleculares está avaliado em US\$ 24.10 bilhões e estima-se que deverá alcançar US\$ 45,55 bilhões em 2020, entre os quais, os de cunho médico, especificamente para diagnóstico e tratamento do câncer chegará a cerca de US\$ 17.000 milhões. O aumento das despesas de saúde e a crescente utilidade de biomarcadores para diagnósticos devem impulsionar o mercado. Esse crescimento será também auxiliado pelo baixo custo dos ensaios clínicos nos países em desenvolvimento e pelas novas iniciativas empreendidas para a pesquisa de biomarcadores (Cluster Salud, 2016).

Por outro lado, a necessidade de alto investimento de capital, baixa relação benefício-custo, sistemas de regulação, reembolso inadequados, alto custo de testes, coleta e armazenamento de amostras são os principais fatores que restringem o crescimento desse mercado. Os principais intervenientes neste mercado incluem QIAGEN NV (Holanda), PerkinElmer, Inc. (EUA), Merck & Co,

Inc. (EUA), Bio-Rad Laboratories (EUA), Enzo Biochem (EUA), EKF Diagnostics Holdings plc), Meso Scale Diagnostics, LLC (EUA), Singulex, Inc. (EUA), BioSims Technologies (França), Cisbio Bioassays (França) e Signosis, Inc. (EUA) (Markets and Markets, 2015).

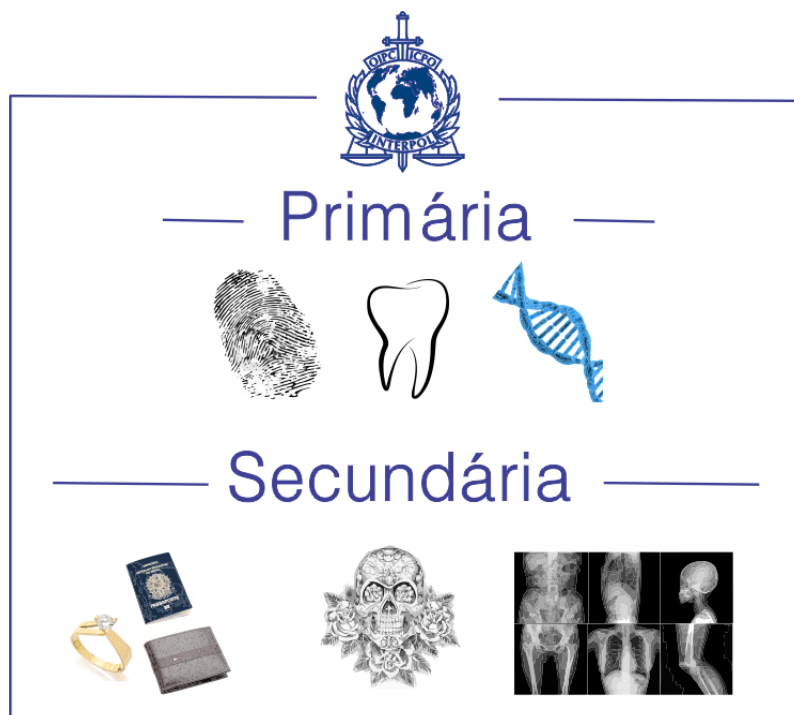
2.2 – MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO HUMANA

A identificação humana é necessária para a caracterização do início e do fim da personalidade civil, sendo estabelecida pelo uso de técnicas e métodos cientificamente comprovados (Santos, 2014).

Todo e qualquer método de identificação deve respeitar determinados critérios, como: Perenidade: Os dados devem perdurar por toda a vida; Imutabilidade: As características não devem alterar-se com o passar do tempo; Classificabilidade: Deve permitir a comparação entre os dados, de forma sistemática e precisa; Variabilidade: Distinção precisa e clara, entre o identificando e os demais (Araújo et al., 2013).

De acordo com o Guia para Identificação de Vítimas de Desastres da INTERPOL, os métodos de identificação podem ser classificados como primários (baseado em dados biológicos): impressões digitais, odontologia legal e DNA e secundários (utilizados quando não são possíveis os primários – baseados em dados acessórios): roupas e pertences, achados médicos, tatuagens, etc. (INTERPOL, 2009) **(Figura 01)**.

Figura 01. Métodos de identificação humana.



Fonte: Primária: Utiliza dados biológicos das vítimas. Secundária: Aborda dados acessórios, quando a identificação primária não é possível. Modificado de INTERPOL, 2009; Santos, 2015.

A identificação humana pelo DNA é, na atualidade, considerada importantíssima para a resolução de situações que envolvam questões criminais, bem como aquelas relacionadas a paternidade e continua revolucionando as áreas jurídicas e criminais (Schumm et al., 2013).

Mesmo com toda a diversidade constatada nas populações humanas e apesar das diferenças que observamos entre os indivíduos de nossa espécie, 99% da sequência do nosso DNA é idêntica. A identificação humana pelo DNA é baseada principalmente nas diferenças observadas entre os indivíduos em regiões não codificantes do genoma. Estas diferenças constituem o princípio básico da metodologia usada na Genética Forense (Roewer, 2013).

Em algumas regiões do genoma, sequências de DNA podem se repetir dezenas ou até centenas de vezes, e o mais interessante, o número de repetições varia entre os indivíduos (Kobachuk, 2012). O Marcador molecular para

identificação humana é justamente uma sequência de DNA que revela polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados ou ainda, podem ser considerados como características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. Em 1985 Jeffreys desenvolveu uma técnica, por ele denominada “DNA fingerprinting”, cuja técnica utilizada para a identificação das sequências hipervariáveis foi denominada RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (Jeffreys et al., 1985b). Essa técnica só foi possível graças à descoberta dessas regiões altamente polimórficas, sendo determinante para o desenvolvimento da metodologia de identificação humana através do DNA.

A partir de então o DNA é usado na investigação de crimes variados, sendo responsável pela descoberta e condenação de inúmeros criminosos (Moreti, 2009). Modernas metodologias de identificação humana estão associadas ao uso de diferentes técnicas para análise de caracteres, notadamente moleculares, que são compartilhados sob formas variadas na população (Guimarães et al., 2009).

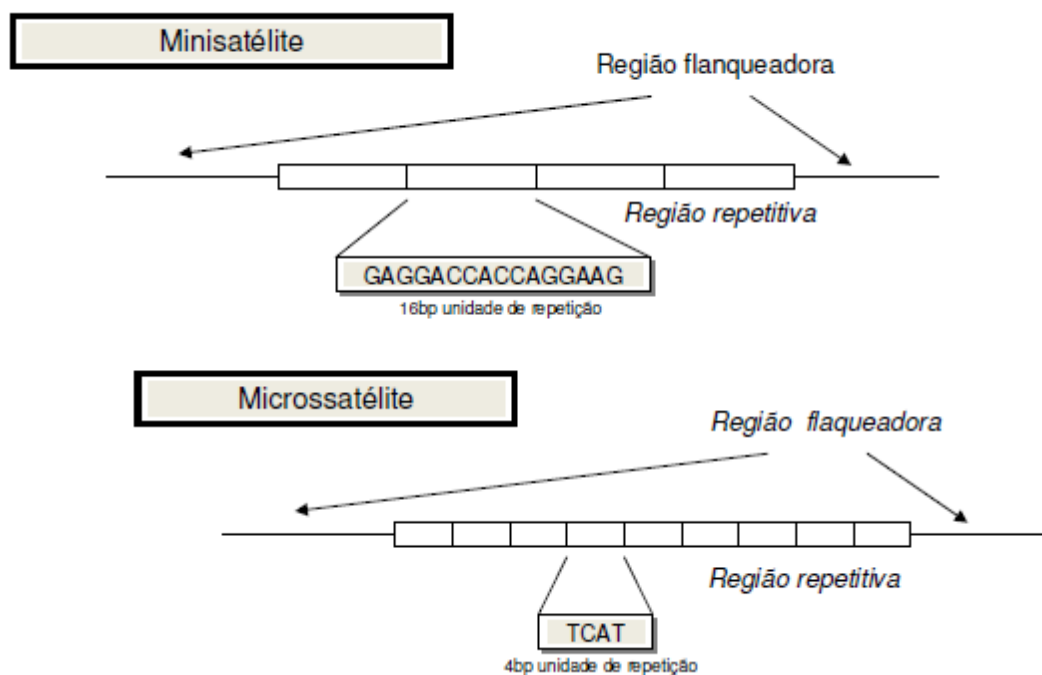
Os marcadores de maior valor para a identificação humana são aqueles que apresentam alto poder de discriminação (maior que 90%), maior frequência de heterozigotos (maior que 70%), baixa taxa de mutação e menor tamanho (Hares, 2012).

Os marcadores de DNA utilizados na identificação humana exibem polimorfismos de sequência ou de comprimento (tamanho). As sequências variáveis que codificam os antígenos do sistema HLA, sequências hipervariáveis do DNA mitocondrial e sequências polimórficas denominadas SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) são exemplos de marcadores com polimorfismos de sequência (Gattás, 2006; Santos, 2014).

O polimorfismo de comprimento pode ser agrupado em duas classes: Os minissatélites ou VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) e os microsatélites ou STRs (*Short Tandem Repeats*) (Fan & Chu, 2007) **(Figura 02)**. Esses dois polimorfismos são os mais utilizados e são as regiões de maior interesse para a identificação humana. A quantidade de repetições presentes determinará para cada indivíduo um tamanho diferente para a região do DNA

estudada. O alelo vai representar cada possibilidade de tamanho (ou de número de repetições) que pode ser encontrada (Oliveira, 2012).

Figura 02. Regiões minissatélites e microsatélites do DNA.



Fonte: Butler, 2005; Santos, 2014.

2.2.1 - VNTRs (Variable Number Tandem Repeats)

O primeiro marcador de DNA empregado na identificação humana foi o VNTR. São sequências hipervariáveis, caracterizados por apresentarem tamanho entre 10 e 100 pares de bases (KOBACHUK, 2012).

Apesar do grande poder de discriminação que os VNTRs oferecem, para que a tipagem seja realizada com sucesso é necessário DNA de alto peso molecular, bem preservado e numa quantidade considerada grande para os padrões forenses. Portanto, apesar do seu alto grau de polimorfismo, essas

regiões não são consideradas adequadas para uso forense, cujas amostras biológicas encontrem-se degradadas ou em quantidades reduzidas (VELHO et al., 2013a).

A partir dos anos 90, a técnica de reação em polimerase (PCR) surgiu como uma alternativa extremamente eficiente em casos cuja quantidade de DNA seja exígua ou degradada. Esta metodologia ganhou rápida aceitação da comunidade científica como ferramenta de biologia molecular para estudos de genética de populações, no diagnóstico molecular, no mapeamento do genoma humano e na identificação humana (Van Oorschot et al., 2010).

2.2.2 - STRs (Short Tandem Repeats)

Os STRs geralmente possuem tamanho entre 2 a 10 pares de bases. Devido ao seu alto poder de discriminação, a análise de STRs se tornou rotina em testes de paternidade e genética forense. Aproximadamente 30% das regiões repetitivas do genoma são de microssatélites. A maioria delas são repetições de dois nucleotídeos, como (AC) $_n$, por exemplo. As mais utilizadas são as repetições de 4 a 5 nucleotídeos (GGAA) $_n$, que ocorrem numa região específica do genoma, em um loco único (Chen et al. 2009).

A nomenclatura dos STRs segue uma ordem pré-estabelecida. A primeira letra do nome do marcador é “D” e significa DNA, depois vem um número que representa em que cromossomo o marcador está localizado, no caso de estar em cromossomos sexuais usa-se “X” ou “Y”, o terceiro elemento do nome é a letra “S”, do inglês, *single copy sequence* que significa sequência de cópia única e finalmente o número do loco em que o marcador foi descrito (Butler, 2005).

Atualmente, a grande maioria das identificações humanas é realizada por meio dos STRs. Esses marcadores são considerados uma poderosa e confiável ferramenta disponível para as análises de DNA que envolvem a identificação humana (Tan et al., 2013).

O FBI (*Federal Bureau of Investigation*) adota e recomenda uma série padrão de *loci* STRs que são seguidos pelos laboratórios de genética forense em vários países e, recentemente publicou novas recomendações que sugerem a

utilização de um número maior de marcadores, sob a alegação de que o conjunto de 13 *loci* propostos inicialmente apresenta eficácia comprovada em situações que envolvem comparações de perfis de fonte única. No entanto, para amostras forenses desafiadoras e que envolvam misturas, a utilização de um número maior de marcadores representa um melhor desempenho. Diante do exposto, o FBI passou a recomendar o uso de no mínimo 20 marcadores (Katsanis & Wagner, 2013). Atualmente os laboratórios de genética forense brasileiros estão adaptando-se ao uso de kits multiplex que amplificam 24 regiões. Estes, geralmente exibem 21 regiões autossômicas, além de regiões de determinação de sexo (**Tabela 1**).

A Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG) recomenda que marcadores microssatélites só sejam aplicados na prática forense mediante estudos das propriedades genético-populacionais e somente se estiverem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentarem alto nível de polimorfismo e possuírem desequilíbrio de ligação conhecido (Szibor, 2007).

A análise de STR's foi bastante facilitada, com a introdução de sistemas de amplificação simultânea (*multiplex*) que permitem obter informação de vários *loci* numa única reação, diminuindo o tempo de estudo, assim como da quantidade de DNA e de reagentes. Diversos *kits* comerciais validados, fornecidos por várias empresas, que permitem a amplificação de múltiplos *loci*, constitui um considerável avanço na resolução de perícias do âmbito da Genética e Biologia Forense, mesmo nas situações mais complexas (JOBIM et al, 2005).

Os critérios utilizados para manter ou retirar determinado *loci* foi o grau de informatividade, o poder elevado de discriminação e baixa taxa de mutação, todavia o principal fator é o melhor desempenho em casos forenses. Os *loci* recomendados foram divididos em 02 seções. A seção A, denominada “necessária” na qual constam 20 *loci*. Nesta seção observa-se a exclusão do *TPOX* e a inclusão dos *loci* *D2S1338*, *D19S433*, *PENTA E* e *D10S1248* já costumeiramente utilizados na rotina dos laboratórios forenses brasileiros e os *loci* *D1S1656*, *D12S391*, *D10S1248*, usados na rotina européia e o *DYS391*. O *TPOX*, assim como o *D22S1045*, *SE33* e o *PENTA D* foram colocados na seção B e

podem ser utilizados se ainda houver necessidade e por ordem de preferência (Hares, 2012).

Tabela 1. Loci recomendados pelo FBI para definição do perfil de DNA forense.

Ordem	Loci inicialmente recomendados	Loci atualmente recomendados
SEÇÃO A (necessário)		
	AMELOGENINA	AMELOGENINA
01	D18S51	D18S51
02	FGA	FGA
03	D21S11	D21S11
04	D8S1179	D8S1179
05	VWA	VWA
06	D13S317	D13S317
07	D16S539	D16S539
08	D7S820	D7S820
09	TH01	TH01
10	D3S1358	D3S1358
11	D5S818	D5S818
12	CSF1PO	CSF1PO
13	TPOX	D2S1338
14		D19S433
15		D1S1656
16		D12S391
17		D2S441
18		D10S1248
19		PENTA E
20		DYS391
SEÇÃO B		
		Ordem de Preferência
21		TPOX
22		D22S1045
23		SE33
24		PENTA D

Fonte: Hares, 2012; Santos, 2014.

Esta é uma maneira de se adequar às orientações do FBI relacionadas ao tipo e a quantidade de marcadores, padronização que favorece a utilização do

CODIS (Combined DNA Index System), Banco de Dados de DNA, adotado em âmbito nacional (SILVA, 2013a).

Dentre as atividades de um laboratório forense de genética deve-se destacar a busca de perfis genéticos presentes em vestígios relacionados à violência sexual, homicídios, crimes contra o patrimônio, entre outras situações. Estes laboratórios também são os responsáveis pela identificação de vítimas de acidentes em massa, além do gerenciamento do banco de dados de perfis genéticos (Silva, et al. 2013a).

No âmbito pericial, as amostras biológicas são comumente classificadas como: amostra de referência (aquelas de origem conhecida, oriundas de vítimas, suspeitos, acusados, réus ou de seus parentes diretos (pai, mãe irmãos, filhos, etc) e amostra questionada (vestígios derivados do local de crime, de objetos relacionados a ocorrências criminais ou de quaisquer outros pontos ou pessoas, cujas origens não sejam conhecidas) (Pernambuco, 2012).

A baixa taxa de elucidação de homicídios no Brasil é preocupante. A fim de reverter este quadro e de avançar a legislação brasileira na direção das mais modernas do mundo, o Governo brasileiro deu um passo histórico para a implantação do banco de dados de perfis genéticos no país. No dia 28 de maio de 2012, foi publicada a Lei nº 12.654, que *“Altera as Leis nos 12.037, de 1º de outubro de 2009, e 7.210, de 11 de julho de 1984 - Lei de Execução Penal, para prever a coleta de perfil genético como forma de identificação criminal, e dá outras providências”* (Brasil, 2012).

Um dos principais fatores para o sucesso de um banco de DNA é a legislação que o regulamenta. Na maioria dos países a legislação começou de forma mais restritiva, armazenando-se apenas os perfis de condenados por crimes hediondos. Este é o modelo ora adotado no Brasil. O tempo mostrou que quanto mais abrangente for a inserção de perfis de criminosos, mais eficiente será o banco de dados. A Lei acima foi regulamentada no dia 12 de março de 2013, através do Decreto nº 7.950, que *“Institui o Banco Nacional de Perfis Genéticos e a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos”* (Brasil, 2013a).

Os Bancos de Dados de DNA podem acelerar as investigações e permitir troca de informações nacional e internacionalmente. O estudo de diferentes

regiões polimórficas do DNA humano, obtidas de vestígios coletados em locais de crimes, organizadas em Bancos de Dados, expande consideravelmente as chances de êxito em investigações criminais (Brasil, 2009).

Os Bancos de Dados de Perfis Genéticos tornaram-se fundamentais para as investigações criminais. Uma das principais utilizações é armazenar perfis de DNA a partir de amostras biológicas coletadas em locais de crime e fazer comparações de perfis posteriormente. Os Bancos de Dados de DNA denotam grande utilidade para identificar criminosos em série (Hares, 2012).

No Brasil, a Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos coordena a implantação de bancos de dados estaduais conectados a um banco de dados nacional por meio do programa CODIS. Trata-se de uma rede efetiva em seu propósito de auxílio à Perícia, aos órgãos policiais e à Justiça, por servir como instrumento de prova na investigação criminal, desde que asseguradas as condições técnicas e científicas para a produção da informação e estabelecidos os parâmetros legais que regulamentem a inclusão, acesso, utilização e exclusão das informações armazenadas nesses bancos (Brasil, 2013b).

O CODIS (*Combined DNA Index System*) é um programa de gerenciamento de perfis genéticos desenvolvido na década de 1990 pelo *Federal Bureau of Investigation* (FBI) estadunidense. O FBI disponibiliza gratuitamente este programa aos governos dos países interessados em utilizá-lo na área de segurança pública. O CODIS permite a organização de perfis genéticos em diferentes categorias, permitindo que os mesmos sejam tratados de forma diferenciada (Brasil, 2009). Os perfis podem ser agrupados pelos seguintes índices: “Condenados”, “Forense”, “Detidos”, “Pessoas Desaparecidas”, “Restos Mortais não-Identificados” e “Parentes Biológicos de Pessoas Desaparecidas” (Santos, 2014).

Assim, familiares de pessoas desaparecidas, por exemplo, podem doar voluntariamente seu DNA para que seja confrontado apenas com restos mortais e não com amostras de locais de crime.

2.3 – MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER CERVICAL

2.3.1 – O câncer cervical

No mundo, cerca de 527.624 novos casos de câncer do colo do útero são diagnosticados, provocando a mortalidade de 265.672 mulheres por ano. O câncer cervical é a quarta causa de morte por câncer no sexo feminino e o segundo tipo de câncer que mais mata mulheres com idades entre 15 e 44 anos (World Health Organization - WHO, 2016).

O Brasil tem uma população de 69,14 milhões de mulheres com idades a partir dos 15 anos, que estão em risco de desenvolver câncer cervical. O câncer cervical aparece como o segundo tipo mais frequente de câncer entre as mulheres e ainda, para o ano de 2016, foram esperados 16.340 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2016) **(Tabela 2)**.

Na análise regional no Brasil, o câncer do colo do útero se destaca como o segundo mais incidente em todas as cinco regiões brasileiras: Norte, Centro-Oeste, Nordeste, Sudeste e Sul, com taxas de 23,97/100mil 20,72/100 mil, 19,49/100 mil, 11,30/100 mil e 15,17/100 mil mulheres, respectivamente. Na região Nordeste, Pernambuco tem uma taxa estimada de 970 novos casos de câncer de colo de útero para cada 100 mil habitantes para o ano de 2016 (INCA, 2016).

Tabela 2: Estimativa para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de números de casos novos por câncer, no Brasil, em mulheres, segundo localização primária. Fonte: INCA, 2016.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Côlon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

*Números arredondados para múltiplos de 10.

2.3.2 – HPV: genoma e infecção

A partir da década de 70, o virologista alemão Harold zur Hausen iniciou os estudos sobre papel do HPV no câncer cervical, até que em meados da mesma década, ele estabeleceu o papel do HPV como sendo o fator promotor para esta neoplasia (zur Hausen, 2002), tal descoberta lhe rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 2008.

De acordo com o *International Council on the Taxonomy of Viruses* (ICTV), o Papilomavírus humano (HPV) pertence à família *Papillomaviridae*, que agrega, atualmente, 29 gêneros (**Figura 03**), dentre os quais cinco têm como hospedeiro o homem: alfa-papilomavirus, beta-papilomavirus, gama-papilomavirus, mu-papilomavirus e nu-papilomavirus (de Villiers *et al.*, 2005). Clinicamente, o gênero alfa-papilomavírus é o mais importante, sendo dividido em espécies 4, 5, 6, 7, 8, 9

Mais de 180 genótipos de Papilomavirus já foram sequenciados e bem caracterizados (Bernard et al. 2010; Deligeoroglou et al., 2013; International Council on the Taxonomy of Viruses - ICVT 2015), sendo que cerca de 40 estão relacionados às infecções anogenitais. Os genótipos virais podem ser classificados quanto ao risco de malignidade que oferecem ao trato genital em: alto-risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82), e baixo risco, associado com lesões benignas genitais e verrugas na pele (HPV6, 11, 40, 42, 43, 44) (Dalstein et al., 2009). O HPV16, assim como o HPV18, são os genótipos virais mais prevalentes em carcinomas cervicais invasivos e neoplasias intraepiteliais cervicais (WHO, 2016).

A organização genômica de todos os HPV é semelhante, possuindo todas as suas regiões com potencial para codificar proteínas, denominadas ORFs (*Open Reading Frames*) numa mesma fita do DNA (Esquenazi et al., 2010). O material genético do vírus é caracterizado por uma dupla cadeia de DNA circular, com aproximadamente oito mil pares de bases (**Figura 4**), constituída por oito genes que são agrupados de acordo com a velocidade pela qual são expressos (Rampias et al., 2014).

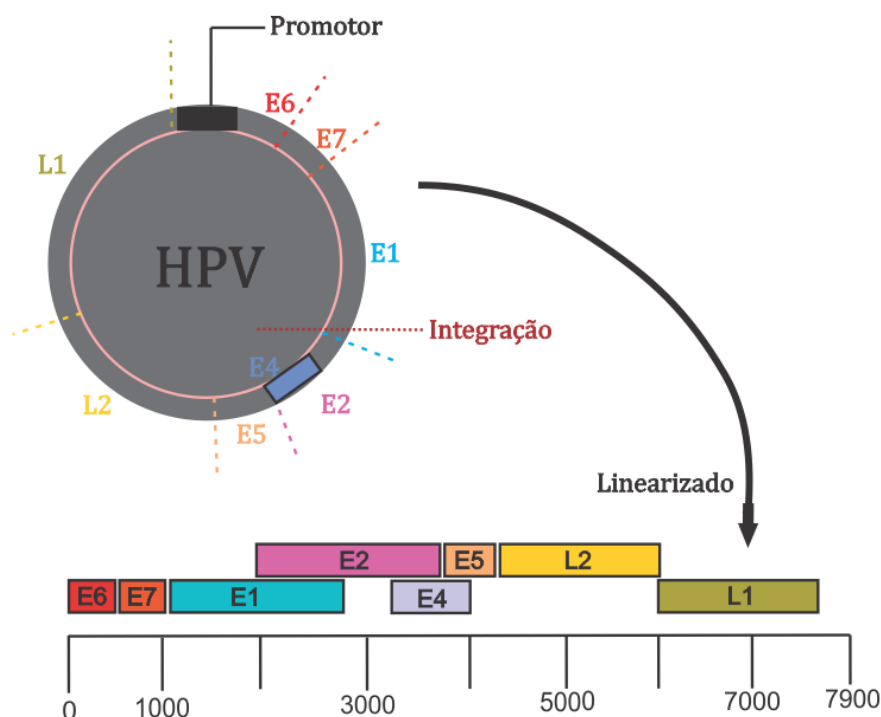
Os genes de expressão tardia "*Late*": L1, de 55kD de tamanho (80% da proteína total viral) e L2, de peso molecular de 70kD codificam proteínas do capsídeo viral. O capsídeo viral possui forma icosaédrica com um diâmetro de 50nm a 60nm, é formado por 72 capsômeros e não é revestido por envelope lipídico. Os genes de expressão rápida "*Early*": E1, E2, E4, E5, E6 e E7 codificam proteínas envolvidas na replicação, transcrição e transformação viral (Stanley et al., 2012).

O genoma viral ainda possui uma região reguladora longa (LCR ou URR) não codificante, apresenta sequências ativadoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação (ORI), variando de 400 a 1000 pb, localizada entre as regiões L1 e E6 (Stanley et al., 2012).

Durante a transcrição, o genoma do HPV é controlado por diversos promotores, dentre os quais, o promotor P97, para o HPV-16, é considerado o principal, sendo responsável pelo direcionamento da expressão de E6 e E7. O genoma do HPV pode sofrer variações por mutações pontuais, deleções e

inserções, que podem se tornar permanentes numa população, se selecionadas positivamente ou, se forem funcionalmente neutras, pela expansão seletiva da população hospedeira infectada (Bernard, 2010).

Figura 4: Representação do mapa genômico do HPV 16.



Fonte: Os genes de expressão tardia —*Late*—: L1, de 55kD de tamanho (80% da proteína total viral) e L2, de peso molecular de 70kD codificam proteínas do capsídeo viral. Os genes de expressão rápida *Early*: E1, E2, E4, E5, E6 e E7 codificam proteínas envolvidas na replicação, transcrição e transformação viral. Modificado a partir de Rampias et al., 2014.

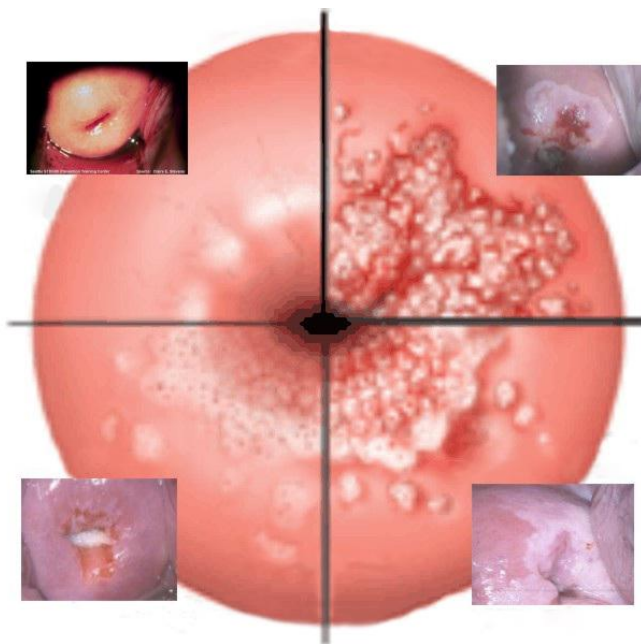
A infecção por HPV ocorre pelo contato direto, através de microlesões na pele que expõem a membrana basal do epitélio, sendo considerada como causa majoritária para o desenvolvimento do câncer cervical, porém apenas 10% das mulheres infectadas por genótipos de alto-risco devem desenvolver a doença (Cavalcanti & Carestiato, 2006).

As vias de transmissão do HPV podem ser sexual, não sexual (familiar ou nosocomial por fômites) ou materno – fetal, podendo ser gestacional, intra e periparto. Entre elas, a via sexual representa a grande maioria dos casos. Outros tipos de contato genital com ausência de penetração, incluindo o sexo oral,

também têm sido relatados. Com relação à via não-sexual, é provável que o HPV possa ser transmitido também pelo instrumental ginecológico, quando não esterilizado adequadamente (Queiroz; Cano; Zaia, 2007).

No momento em que o vírus linearizado se integra ao genoma do hospedeiro, começa a se desenvolver uma lesão, conhecida como NIC (Neoplasia Intraepitelial Cervical) (**Figura 05**). As várias alterações celulares causadas pelo vírus foram classificadas em NIC I, NIC II e NIC III (Queiroz et al., 2005). A lesão escamosa de baixo grau, que corresponde a NIC I, apresenta células com binucleação, disqueratose e outras alterações, sendo uma condição tratável e com boas chances de regressão. Já as alterações de alto grau, que são NIC II e NIC III, apresentam alterações no processo de crescimento e diferenciação celular e contrastam com a displasia de baixo grau, em relação a maior chance de regressão, visto que essa alteração tem maior chance de se tornar um carcinoma *in situ*, seguindo para o câncer invasor (Albring et al., 2006).

Figura 05. Diferentes graus de lesões cervicais de acordo com a colposcopia.



Fonte: American society colposcopy and cervical pathology, Seattle STD/HIV prevention training center, Hopkins Medicine. Disponível em: <http://gineco.med.br/hpv/>

O ciclo de vida do HPV inicia-se por um processo infeccioso que ocorre na camada basal de queratinócitos do epitélio, resultando numa infecção clínica ou subclínica (**Figura 06**).

No primeiro estágio do ciclo viral, o genoma do HPV é estabilizado na forma de elemento extracromossômico (epissomo) na célula basal epitelial, o qual é replicado para um número de 50 a 100 cópias aproximadamente junto com o DNA do hospedeiro, na fase S (Rampias et al., 2014). Os primeiros genes a serem expressos são E1 (helicase) e E2 que formam um complexo para se ligar à origem de replicação do genoma viral e recrutar a maquinaria necessária da célula, como polimerase e proteínas acessórias (Mohr *et al.*, 1990; Frattini *et al.*, 1994; Conger *et al.*, 1999). Além disso, a proteína E2 funciona como um fator de transcrição que ativa ou reprime a transcrição dos outros genes E (McBride et al., 1991).

O segundo estágio do ciclo corresponde a um alto nível de expressão de proteínas virais não-estruturais (E4) e estruturais (L1 e L2) para a montagem dos vírions e sua liberação. A proteína E4 facilita a liberação dos vírions através do rompimento do citoesqueleto citoplasmático (Doorbar *et al.*, 1999). Nesta fase, ocorre a migração de uma das células infectadas para as camadas mais superiores (sentido apical) do epitélio com a finalidade de acompanhar o programa de diferenciação dos queratinócitos enquanto isso, a célula-filha infectada que permaneceu na camada basal se multiplica e mantém um verdadeiro reservatório de DNA viral (McCance, 2005).

O processo de transformação maligna das células infectadas pelo HPV é mediado através da interação entre os produtos dos genes virais E6 e E7 e as suas oncoproteínas, que têm demonstrado serem suficientes para garantir a transformação, imortalização celular e formação do tumor (Rampias et al., 2014).

A atividade transformadora da oncoproteína E6 é dependente da sua ligação com a proteína supressora de tumor p53 por uma via ubiquitina-dependente (Thomas *et al.*, 1999). A associação da E6 com a p53 é mediada por uma proteína celular adicional, chamada proteína associada a E6 (E6-AP). A formação do complexo E6-p53 é fundamental para a inativação das funções supressoras da p53. Essa parece ser uma atividade específica dos HPV de alto risco, visto que os de baixo risco que codificam E6 não inativam a p53 pelo

mesmo mecanismo (Werness *et al.*, 1990). Embora os efeitos da oncoproteína E6 de alto risco sobre a p53 sejam fundamentais para o desenvolvimento de câncer genital, rotas alternativas e independentes da p53 desempenham papéis igualmente importantes (Moody *et al.*, 2010).

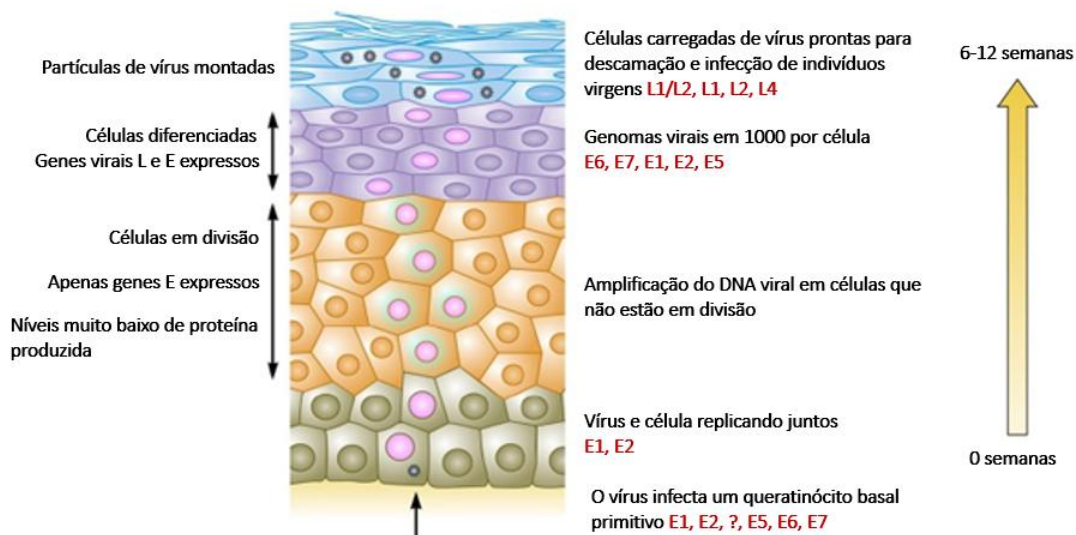
A proteína E7 também contribui para a imortalização celular devido à sua capacidade de interagir com a proteína supressora tumoral do retinoblastoma (pRb), assim como membros de sua família, a p107 e p130. A família do Rb controla a transição de fase G1 para S, regulando a atividade da família de fatores de transcrição E2F (Dyson *et al.* 1998). Além de formar complexos com a pRb, a E7 também orienta a degradação através da via proteossômica ubiquitina-dependente (Boyer *et al.* 1996) induzindo a anti-apoptose.

Desta maneira, os oncogenes E6 e E7 dos HPV de alto risco quando co-expressos podem facilitar a imortalização de células epiteliais primárias. A contínua expressão de E6 e E7 é necessária para a manutenção do fenótipo transformado em quase todos os carcinomas cervicais. Este processo é potencializado pela ação de outra oncoproteína viral, a E5 (Moody *et al.*, 2010), na qual sua expressão prolongada causada pela infecção persistente possibilita o acúmulo de aberrações cromossômicas que culminam em transformação maligna (Duesing e Munger, 2004).

O tempo de infecção até a liberação das partículas virais é de aproximadamente três semanas e corresponde ao tempo necessário para a diferenciação completa e descamação do queratinócito basal (Stanley, 2012). O tempo entre a infecção inicial e o aparecimento de papilomas pode depender da concentração e do tipo do vírus que infecta o tecido, também é sugerido que o estado de latência pode resultar da baixa concentração de vírus inoculado (Zhang *et al.*, 1999).

O HPV adota vários mecanismos que impedem uma resposta eficiente do sistema imunológico, dentre eles não provocar lise celular durante a liberação do vírus, que ocorre com a morte programada dos queratinócitos (descamação). Deste modo, os sinais essenciais para a resposta imune no epitélio estão ausentes, como a produção de citocinas pró-inflamatórias que ativam a migração das células apresentadoras de antígenos (APCs) (Stanley, 2012).

Figura 06: Esquema mostrando a evolução da infecção pelo Papilomavírus humano.

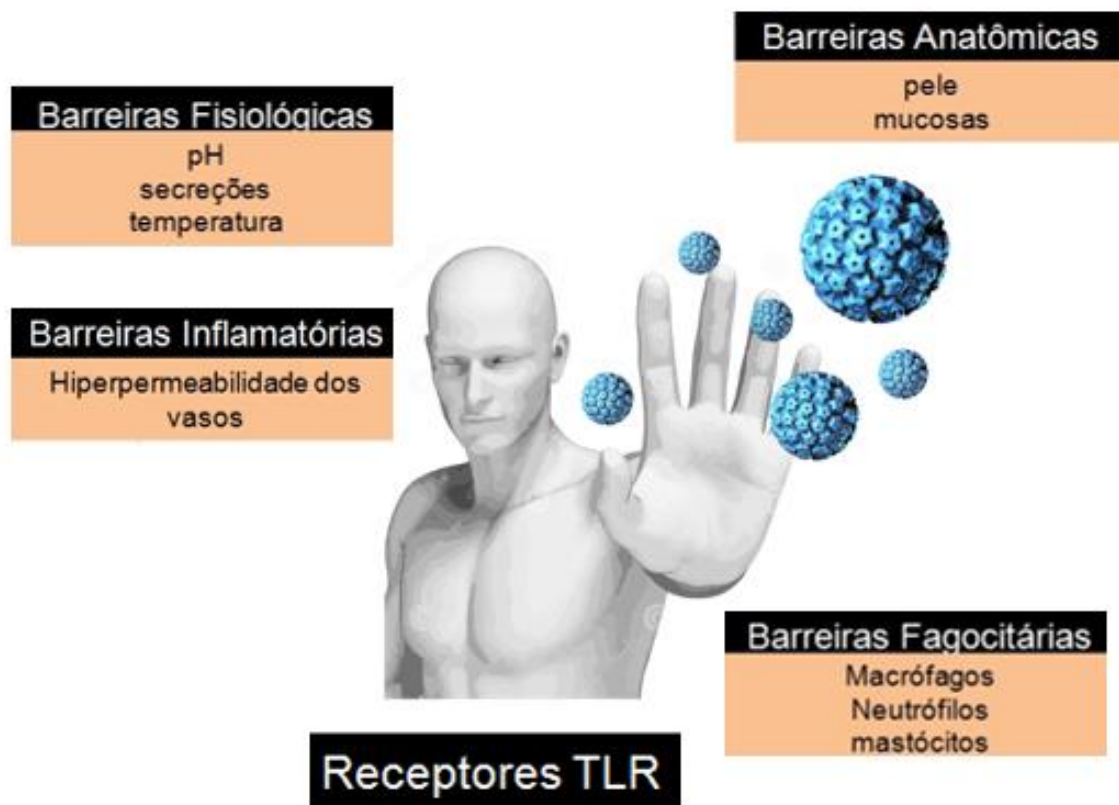


Fonte: O ciclo de vida do HPV inicia-se por um processo infeccioso que ocorre na camada basal de queratinócitos do epitélio, resultando numa infecção clínica ou subclínica. No primeiro estágio do ciclo viral, o genoma do HPV é estabilizado na forma de elemento extracromossômico (episssomo) na célula basal epitelial, o qual é replicado para um número de 50 a 100 cópias aproximadamente junto com o DNA do hospedeiro. No segundo estágio, ocorre a migração de uma das células infectadas para as camadas mais superiores (sentido apical) do epitélio com a finalidade de acompanhar o programa de diferenciação dos queratinócitos enquanto isso, a célula-filha infectada que permaneceu na camada basal se multiplica e mantém um verdadeiro reservatório de DNA viral. Modificado a partir de Stanley et al., 2012.

2.3.3 – Sistema Imune Inato e TLRs

A imunidade inata (**Figura 07**) é a parte não específica do sistema imunitário. É mediada pela barreira epitelial, o sistema complemento, uma variedade de células que fagocitam antígenos e os apresentam para outras células ou os destroem além de uma vasta família de receptores imunológicos, chamados de receptores *Toll-like* (TLRs). Estes desempenham um papel crucial na imunidade inata. Eles podem ser encontrados em várias células da imunidade inata e reconhecer ameaças endógenas e exógenas, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A ativação dos TLRs provoca um perfil de expressão pró-inflamatório, que promove esse tipo de imunidade (Derigeoroglou et al., 2013).

Figura 07: As diversas barreiras presentes no sistema imune inato humano.



Os receptores Toll-like (TLRs) foram descobertos pela primeira vez como receptores envolvidos no reconhecimento de fungos e embrião na determinação da polaridade dorsoventral em embriões de *Drosophila* (Anderson et al., 1985; Lemaitre et al., 1996). Os TLRs são uma importante classe de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), sendo descobertos até o momento 11 TLRs em humanos (TLR1-TLR11) e 13 em ratos (Beutler, 2009; Reuven et al., 2014).

Como os seres humanos têm um pequeno número de receptores da imunidade inata disponíveis para responder a um número ilimitado de moléculas microbianas, esses receptores possuem uma grande flexibilidade (Kang et al., 2011).

Os TLRs reconhecem PAMPs e atuam como ativadores de cascatas que levam a respostas imunológicas imediatas, e como ligantes para o recrutamento e

ativação do sistema imune adaptativo (Akira et al., 2004; Kanczkowski et al., 2007). Após o reconhecimento dos PAMPs pelos TLRs, esses receptores sofrem mudanças conformacionais que permitem o recrutamento das moléculas adaptadoras. Inicia-se então, uma cascata de sinalização intracelular que resulta na produção de citocinas inflamatórias como TNF α , IL6, IL8, IL10 e IL12 e no aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras nas APCs (Células Apresentadoras de Antígenos). Além do mais, muitos TLRs são capazes de induzir a produção de IFN tipo I, importante citocina de ação antiviral. Essa característica de induzir uma série de citocinas inflamatórias é resultado da ativação de fatores de transcrição como o IRF3 (Fator de Regulação de Interferon 3) (Akira et al., 2004; Reuven et al., 2014)

A atividade dos TLRs é altamente regulada, sendo multifacetada e envolvendo regulação sistêmica, sinalização de regulação e interações proteína-proteína, tudo servindo para manter a atividade TLR bem eficiente (Seimon et al., 2010).

Devido ao seu envolvimento em tais processos essenciais, a integridade genômica desses receptores é fator chave na presença ou ausência de distúrbios imunológicos e, conseqüentemente, na susceptibilidade ou não a doenças. Alguns distúrbios genéticos nos genes TLR já foram correlacionados com muitas doenças causadas por vírus (Nischalke et al., 2011), inclusive pelo HPV (Daud et al., 2011) e diversos tipos de cânceres, entre eles o gástrico (Castaño-Rodriguez et al., 2013) e o cervical (Pandey et al., 2009; Roszak et al., 2012), e pode ter conseqüências fatais.

A descoberta de antagonistas de TLRs pode ser uma estratégia notável para tratar cânceres, incluindo o cervical, no entanto, os antagonistas de TLRs podem representar o risco de comprometimento da imunidade do hospedeiro (Pandey et al., 2009). Por conseguinte, é um dilema científico se um agonista ou antagonista de TLRs deve ser alvo de tratamento para essa patologia, podendo ser utilizados como biomarcadores moleculares.

2.3.4 – Marcadores Moleculares no Câncer

A principal abordagem para conter o avanço do câncer cervical é o rastreamento através do exame citológico, cujo principal objetivo é detectar lesões pré-neoplásicas antes que elas possam progredir para um estágio invasivo. Países mais desenvolvidos conseguem implantar programas de rastreamento organizados, com alta cobertura da população-alvo, além de diagnóstico e tratamento adequados e em tempo hábil. Isso reduz drasticamente a incidência da doença, porém manter toda a infraestrutura e logística desses programas implica investimentos substanciais em saúde, o que constitui uma barreira para países com menos recursos (Crisóstomo et al., 2016). Diante dessas dificuldades, tem-se fomentado a busca por métodos auxiliares que ajudem a otimizar o rastreio citológico, tornando-o mais sensível e ainda mais eficiente.

Há um interesse atual na utilização de biomarcadores moleculares como método auxiliar aos procedimentos de triagem vigentes. Existem vários trabalhos avaliando o potencial clínico desses marcadores e os que se mostram mais propícios são moléculas envolvidas na regulação do ciclo celular ou marcadores de infecção por HPV, o principal agente etiológico no desenvolvimento do câncer cervical (Astbury et al., 2006).

Segundo Anghebem-Oliveira; Merlin (2010) e Weber (2012), marcador é qualquer molécula que possa ser detectada e dosada, assim revelando um processo normal ou patológico no organismo, auxiliando no diagnóstico da doença, na detecção do grau da lesão, no monitoramento da terapêutica, e no prognóstico para o paciente. Os biomarcadores tumorais são indicadores do estado fisiológico e de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico. A expressão destes marcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, tais como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros.

Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo maligno, correlaciona-se com a massa tumoral, permite a caracterização do tipo

de tumor, a localização, o estadiamento do tumor, bem como fornece uma avaliação prognóstica do tumor em questão (Crisóstomo et al., 2016).

Um bom marcador para câncer uterino deve ser sensível e específico, sendo capaz de distinguir lesões de alto e baixo grau e também de avaliar o risco de progressão e as chances de regressão. Entre os marcadores já detectados, se encontram a proteína p53, o anticorpo contra a proteína Ki67 (MIB-1), a *Heat Shock Protein* 40 e 60 (HSP40 e HSP60) (Almeida et al., 2014). No entanto, tais marcadores são utilizados em imunohistoquímica, ou seja, quando as lesões e possivelmente o câncer já estão instalados.

Desta forma, tem-se uma carência de marcadores moleculares genéticos precoces para a detecção do câncer cervical, inclusive sob a abordagem de kit comercial, como observado, por exemplo no câncer de mama para o BRCA1, *Mamaprint* (Simphony®) e *Oncotype DX*® (Li et al., 2016). Painéis moleculares como estes agregariam inúmeros benefícios para os pacientes portadores de câncer cervical, principalmente em relação à sensibilidade e o tardamento do exame citológico.

Diante do exposto, é imprescindível a busca de novos marcadores moleculares mais eficientes, principalmente no que diz respeito à precocidade e, aprimorar os já existentes.

REFERÊNCIAS

Albring, L, Brentano JE, Vargas VRA. O câncer do colo do útero, o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 38, n. 2, p. 87-90, 2006.

Almeida AC, Oliveira KB. Câncer de colo uterino: desenvolvimento, diagnóstico, tratamento e marcadores moleculares. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 7, n. 1, p. 155-161, 2014.

Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product, *Cell* 42 791–798, 1985.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling, *Nature Reviews Immunology*, 4:499–511, 2004.

Anghebem-Oliveira MI, Merlin JC. A proteína p16 é um novo marcador para progressão neoplásica no colo uterino? *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v. 42, n. 3, p.181-185, 2010.

Araújo LG, Biancalana RC, Terada ASSD, Paranhos LR, Machado CEP, Silva RHA. Human identification of victims of mass disasters: the importance and role of Forensic Dentistry Human Identification of victims of mass disasters: the importance and role of Forensic Dentistry. *RFO* 18:224-229, 2013.

Astbury K, Martin CM, Ring M, Pilkington L, Bolger N, Sheils OM, O’leary JJ. Future molecular aspects of cervical cytology. *Currently diagnostic pathology*, 12, n. 2, p. 104-113, 2006.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401, 70–79, 2010.

Beutler,BA. TLRs and innate immunity. *Blood*, 113, 1399–1407, 2009.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human Papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin proteasome pathway. *Cancer Research*, 56: 4620–4624, 1996.

Brasil. Projeto Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos. A Implantação do CODIS, 2009.

Brasil. Lei nº 12.654, de 28 de maio de 2012. Casa Civil. Subchefia para assuntos jurídicos. Publicada no DOU de 29.5.2012. <http://www4.planalto.gov.br/legislacao/legislacao-1/leis-ordinarias>. Acesso 03/02/2017, 2012.

Brasil. Decreto 7.950, de 12 de março de 2013. Casa Civil. Subchefia para assuntos jurídicos. Publicado no DOU de 13.3.2013. <http://www4.planalto.gov.br/legislacao/legislacao-1/decretos>. Acesso em 05/02/2017, 2013a.

Brasil. Portaria 2774, de 19 de agosto de 2013. Ministério da Justiça. Publicado no DOU de 21.8.2013. <http://www4.planalto.gov.br/legislacao/legislacao>. Acessado em 04/02/2017, 2013b.

Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR markers. *Press*, 2005.

Butler JM, Hill CR. Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. *Forensic Science Reviews*. 21:15–26, 2012.

Castano-Rodríguez N, Kaakoush NO, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM. The Role of TLR2, TLR4 and CD14 Genetic Polymorphisms in Gastric Carcinogenesis: A Case-Control Study and Meta-Analysis. *Plos One*, 8: 4, 2013.

Cavalcanti SMB, Carestiato FN. Infecções causadas pelos Papilomavírus humanos: atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnóstico. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, 18(1): 73-79, 2006.

Chen Y, Huang XJ, Liu KY, Chen H, Chen YH, Zhang XH, Wang Y, Wang FR, Han W, Wang JZ, Yan CH, Xu LP. Association between C-reactive protein levels in the first 1–3 days post-transplant and allogeneic immune reactions. *Biomarkers in Medicine*. 11, 2:117-124, 2017.

Chen DP, Tseng CP, Tsai SH, Wang MC, Lu SC, Wu TL, Chang PY, Sun CF. Use of X-linked short tandem repeats loci to confirm mutations in parentage caseworks. *Clinica Chimica Acta* 408:29-33, 2009.

Cluster & Salud. 13 de setembro de 2016. Acesso em 28 jan 2017. Disponível em: <http://clustersalud.americaeconomia.com/cancer-mercado-global-biomarcadores-escalara-us-17-000-millones-2022/>.

Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS. Human Papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase. *Journal of Biological Chemistry*, 274:2696-2705, 1999.

Crisóstomo CA, Melo-Júnior MR, Medeiros ALPB. Marcadores moleculares como ferramenta auxiliar no diagnóstico citológico de anormalidades cervicais. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 7, n. 1, p. 155-161, 2016.

Dalstein V, Merlin S, Bali C, Saunier M, Dachez R, Ronsin C. Analytical evaluation of the PapilloCheck test, a new commercial DNA chip for detection and genotyping of human papillomavirus. *Journal of Virology Methods*, 156: 77–83, 2009.

Daud II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB. Association between Toll-like Receptors expression and Human Papillomavirus Type 16 Persistence. *International Journal of Cancer*. February 15; 128(4): 879–886, 2011.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* , 324(1):17-27, 2005.

Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, Creatsas G. HPV Infection: Immunological Aspects and Their Utility in Future Therapy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, Article ID 540850, 9 pages, 2013.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352:824-7, 1999.

Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human Papillomavirus oncoproteins. *International Journal of Cancer*, 109(2):157-62, 2004.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Development*, 12: 2245–2262, 1998.

Esquenazi D, Filho IB, Carvalho MGC, Barros FS. A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. *Jornal Brasileiro de Otorrinolaringologia*, 76 (1): 78-84, 2010.

Fan H, Chu JY. A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics and Bioinformatics*, 5:7-14, 2007.

Frattini MG, Laimins LA. Binding of the human Papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91:12398-12402, 1994.

Gattás GJF. Polimorfismos de DNA e suas aplicações em ciências forenses da saúde. Tese. Universidade de São Paulo, 2006.

Guimarães MA, Soares-Vieira JA, Silva RHA, Evison MP. A standard procedure for accommodating forensic anthropological and genetic analysis of decomposing human remains from tropical climates. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2:165–166, 2009.

HARES DR. Expanding the codis core loci in the United States. *Forensic Science International: Genetics* 6:52-54, 2012.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2015 Release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> Acesso em: 24 jan. 2017.

Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INTERPOL. International Criminal Police Organization. Interpol DVI Guide. Lyon: OIPC – Interpol; 2009. Disponível em: <http://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DVI-Pages/DVI-guide>. Acesso em 04/11/2016.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable “minisatellites” Regions in Human DNA. *Nature* 314-73, 1985b.

Jobim LF, Costa LRS, Silva M. Identificação Humana. Campinas: Millennium, 2005.

Kanczkowski W, Morawietz H, Ziegler CG, Funk RH, Schmitz G, Zacharowski K, Mohn CE, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Pam3CSK4 and LTA-TLRs ligands associated with microdomains induce IL8 production in human adrenocortical cancer cells. *Hormone and Metabolism Research Journal*, 39:457–460, 2007.

Kang JY, Lee JO. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annual Reviews* 80:917–941, 2011.

Katsanis SH, Wagner JK. Characterization of the Standard and Recommended CODIS Markers. *Journal of Forensic Sciences*, 58, 2013.

Kobachuk LDG. Estudo de Frequências Alélicas de Dez Locus STRs do Cromossomo X na População do Estado do Paraná e sua Contribuição na Identificação Humana. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2012.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, 86:973–983, 1996.

Li H, Zhu Y, Burnside, Drukker K, Hoadley KA, Fan C, Conzen SD, Whitman GJ, Sutton EJ, Net JM, Ganott M, Huang E, Morris EA, Perou CM, Ji Y, Giger ML. MR Imaging Radiomics Signatures for Predicting the Risk of Breast Cancer Recurrence as Given by Research Versions of MammaPrint, Oncotype DX, and PAM50 Gene Assays. DOI: <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.2016152110>.

Marktes and Markets. Julho de 2015. Acesso em 28 jan 2017. <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomarkers-advanced-technologies-and-global-market-43.html>.

McBride AA, Romanczuk H, Howley PM. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 266:18411-4, 1991.

McCance DJ. Transcriptional regulation by human papillomaviruses. *Genetics & Development*, 15:515-519, 2005.

Moody CA, Laimins LA. Human Papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews*, 10: 550-60, 2010.

Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the Papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*, 250:1694-99, 1990.

Moreti T. Identificação humana: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina, 2009. 145f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.

Nischalke HD, Coenen M, Berger C, Aldenhoff K, Muller T, Berg T, Kramer B, Korner C, Odenthal M, Schulze F, Grunhage F, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. The toll-like receptor 2 (TLR2) -196 to -174 del/ins polymorphism affects viral loads and susceptibility to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *International Journal of Cancer*, 130:1470, 2010.

Oliveira TMM. Análise da frequência alélica de 15 loci STR na população do Rio Grande do Norte. Dissertação de mestrado. Universidade do Rio Grande do Norte. 2012.

Pandey S, Mittal RD, Srivastava M, Srivastava K, Singh S, Srivastava S, Mittal B. Impact of Toll-like receptors TLR 2 (-196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. *Gynecologic Oncology*, 114: 501, 2009.

Pernambuco. Secretaria de Defesa Social de Pernambuco. Portaria GAB/SDS Nº 1440/2012, 2002.

Queiroz DT, Pessoa SMF, Sousa RA. Infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV): incertezas e desafios. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 18, n. 2, p. 190-196, 2005.

Queiroz AMA, Cano MAT, Zaia JE. O Papilomavírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG. *Revista brasileira de análises clínicas*, v.39(2): 151-157, 2007.

Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncology* 50:356–363, 2014.

Reuven EM, Fink A, Shai Y. Regulation of innate immune responses by transmembrane interactions: Lessons from the TLR family. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1838:6:1586-1593, 2014.

Roewer L. Y DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investigative Genetics*, 5:77-84, 2013.

Roszak A, Lianeri M, Sowinska A, Jagodzinski PP. Involvement of toll-like receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Molecular Biology Reports*, 39:8425–8430, 2012.

Santos SM. Identificação humana como ferramenta de investigações criminais: Estudo de frequências alélicas de marcadores forenses no Estado de Pernambuco. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. 2014.

Seimon TA, Nadolski MJ, Liao X, Magallon J, Nguyen M, Feric NT, Koschinsky ML, Harkewicz R, Witztum JL, Tsimikas S, Golenbock D, Moore KJ, Tabas I.

Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell*, 12:650 467–482, 2010.

Schumm JW, Gutierrez-Mateo C, Tan E, Selden R. A 27- Locus STR Assay to Meet All United States and European Law Enforcement Agency Standards. *Journal of Forensic Sciences* 58:6, 2013.

Silva EFA, Jacques GS, Chemale G, Francez PA. Genética Forense. Millenium. 2013a.

Stanley, MA. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews* p. 215–222, 2012.

Szibor R, Hering S, Edelmann J. A new Web site compiling forensic chromosome X research is now online. *International Journal of Legal Medicine* 120:252-254, 2006.

Tan E, Turingan RS, Hogan C, Vasantgadkar S, Palombo L, Schumm JW, Selden RF. Fully integrated, fully Automated generation of short tandem repeat profiles. *Investigative Genetics*, 4:16, 2013.

Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, 18(53):7690-700, 1999.

Van Oorschot RAH, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA: a review *Investigative Genetics* 1:14, 2010.

Velho JA, Costa KA, Damasceno CTM. Locais de Crime dos Vestígios à Dinâmica Criminosa. Campina. Millenium. 2013a.

Weber AAP. PROEX C para o diagnóstico de lesões intraintra-epiteliais no colo do útero. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

Werness BA, Levine J, Howley PM. Association of human Papillomavirus types 16 and 18 proteins with p53. *Science*, 248(4951):76-9, 1990.

World Health Organization. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. Version posted at www.hpvcentre.net on 15 December 2016. Acesso em: 24 jan. 2017.

Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*, 263:388–94, 1999.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, 2:342, 2002.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Aplicar marcadores moleculares na identificação de amostras humanas e identificar marcadores moleculares na infecção pelo HPV e câncer cervical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar 24 marcadores STRs para identificação humana em amostras oriundas de local de crime;
- Identificar possíveis marcadores moleculares envolvidos na infecção pelo HPV e no câncer cervical.

ARTIGO I - DNA FORENSE APLICADO NA IDENTIFICAÇÃO DE VÍTIMAS DE CRIMES EM PERNAMBUCO, BRASIL

DNA forense aplicado na identificação de vítimas de crimes em
Pernambuco, BrasilM.H.F. Ekert ^{a,*}, N.C.L. Oliveira ^b, C.A. de Souza ^c, S.M. Santos ^c, D.B.G. Martins ^b,
J.L.L. Filho ^b^a Instituto de Criminalística, Perícia Oficial de Alagoas, Maceió (AL), Brasil^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Recife (PE), Brasil^c Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense, Recife (PE), Brasil*Endereço de e-mail para correspondência: marek.henryque@gmail.com, Tel.: +55-82-9-9804-3995.

Recebido em 21/01/2016; Revisado em 29/06/2016; Aceito em 02/07/2016

Resumo

Introdução: A identificação humana por DNA é atualmente considerada crucial para a resolução de situações envolvendo matéria penal, bem como aquelas relacionados à paternidade e continua revolucionando as áreas jurídicas e penais. As principais regiões

polimórficas de DNA usados na rotina forense são os STRs (Short Tandem Repeats) presentes nos cromossomos autossômicos. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo identificar o perfil das vítimas afetadas por vários tipos de crimes ocorridos em Pernambuco. **Materiais e Métodos:** O Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF) proveu 125 casos de vários tipos de crimes ocorridos em Pernambuco entre 2012 e 2014. A verificação de identificação humana por amostras de músculo e osso foi realizada por amplificação de DNA e genotipagem pela alimentação do sistema Plex Fusion (24 loci STR) e ABI PRISM 3500 HID respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas pelos softwares: "familias" e "patcan". **Resultados:** O LPPGF recebeu dois tipos de amostras biológicas para os ensaios de identificação genética humana: tecido ósseo (52,8%) e o tecido muscular (47,2%). A alta prevalência de casos em aberto (47,2%) e homicídio (42,4%), tanto na área metropolitana, quanto no interior, alerta a necessidade de implementar programas sociais de prevenção e qualidade de vida, além da necessidade de mais celeridade nas investigações policiais. **Conclusões:** A abordagem genética para identificação humana, principalmente vítimas de crimes, é uma condição importantíssima para a resolução de qualquer tipo de processo criminal e reduzir ainda mais a agonia vivida por famílias que tiveram seus entes queridos desaparecidos.

Palavras-Chave: Identificação humana; DNA Forense; STRs; Homicídio.

Abstract

Introduction: The human identification by DNA is currently considered crucial for the resolution of situations involving criminal matters as well as those related to paternity and continues revolutionizing the legal and criminal areas. The main polymorphic regions of DNA used in forensic routine are the STRs (short tandem repeats) present in autosomal chromosomes. **Objective:** This study aimed to identify a profile of victims affected by several kinds of crimes that occurred in Pernambuco. **Materials and Methods:** Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF) provided 125 reports of several kinds of crimes that occurred in Pernambuco between 2012 and 2014. Verification of human identification by muscle and bone samples was performed by DNA amplification and genotyping by Power Plex Fusion System (24 loci STRs) and ABI PRISM 3500 HID respectively. Statistical analyzes were carried out by software: "familias" and "patcan". **Results:** LPPGF received two types of biological samples for human identification genetic test: bone tissue (52.8%) and muscle tissue (47.2%). the high prevalence of open cases (47.2%) and murder (42.4%), both metropolitan area, as up-state alerts the need to implement improvements social programs of prevention and quality and speed of police investigations. **Conclusions:** The genetic approach to human identification, mainly victims of crimes, is very important for resolving any kind of criminal case and further reduce the agony experienced by families who had their missing loved ones.

Keywords: Human Identification; Forensic DNA; STRs; Murder.

1. INTRODUÇÃO

A identificação humana é um processo de investigação forense necessário para caracterizar o início e o fim da personalidade civil [1]. O evento da morte de um indivíduo extingue o poder familiar, limites de casamento, contratos pessoais e usufruto e, sem confirmação não inicia o processo de sucessão [2]. Além disso, a identificação humana é uma questão jurídica de importância em casos criminais, exigindo a necessidade de investigação [3].

A busca de métodos confiáveis de identificação humana sempre foi uma grande necessidade social. Em diversas situações, tais como guerra, agitação sócio-política e de desastres de massa mostram a necessidade urgente de uma ação eficaz para identificar as vítimas, com o objetivo de suavizar de alguma forma a ansiedade social que sempre se instala [4].

A identificação humana por DNA é atualmente considerada crucial para a resolução de situações que envolvem matéria penal, bem como os relacionados com a paternidade e continua revolucionando as áreas legais e criminais [5]. Esta abordagem baseia-se principalmente nas diferenças entre indivíduos em regiões não codificantes do genoma. Estas diferenças são o princípio básico da metodologia utilizada em Genética Forense [6].

Em seqüências de DNA repetitivas são encontradas repetições “in tandem” que podem determinar regiões hipervariáveis classificáveis por polimorfismos [7]. As principais regiões polimórficas do DNA utilizadas na rotina forense são os STRs (short tandem repeats) presentes nos cromossomos autossômicos. O tipo e quantidade mínima de marcadores são validados e sugeridos por renomadas instituições nacionais e internacionais [8,9]. Quanto maior o número de marcadores e mais estudadas as frequências alélicas desses marcadores na população local, maiores as chances de sucesso na identificação forense [10,11].

Devido à falta deste tipo de estudo na população do Nordeste do Brasil, o presente artigo objetivou caracterizar um perfil geral das vítimas acometidas por vários tipos de crimes que ocorreram em Pernambuco entre 2012 e 2014, abrangendo variáveis como sexo, amostra utilizada e localização geográfica da agressão, após sua identificação pelo DNA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Neste estudo, o Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense de Pernambuco (LPPGF-PE) proveu 125 relatórios policiais com laudos genéticos de vários tipos de crimes que ocorreram em Pernambuco entre 2012 e 2014.

2.2. Métodos

2.2.1 Extração e Quantificação de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras biológicas por dois métodos diferentes: por extração orgânica (utilizada em amostras questionadas) e usando kits de DNA IQTM System Promega® (utilizada em amostras de referência).

As amostras biológicas utilizadas foram de osso e músculo, visto que para estas o LPPGF possui validação metodológica. A escolha da primeira, última ou ambas, variou de acordo com o caso e a disponibilidade das mesmas. Estas amostras eram entregues ao LPPGF oriundas do IML.

A quantidade de DNA recuperado foi quantificada por PCR em Tempo Real, utilizando o reagente Quantifiler® Duo DNA Quantificação Kit (Life Technologies) juntamente com o sistema de PCR Tempo Real 7500 (Life Technologies).

2.2.2 Amplificação do DNA

As amostras de DNA extraídas foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o sistema de análise de loci de STR PowerPlex Fusion System (Promega Corporation), com um total de 24 loci.

2.2.3 Genotipagem do DNA

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese capilar utilizando o equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer HID (Applied Biosystems), no qual 22 (loci) STR foram analisados (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, PENTA E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, PENTA D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D221045), além do gene da ameloginina e do fragmento do cromossomo Y, DYS391, para identificar o gênero sexual.

Todas as metodologias moleculares foram abordadas de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes e, ainda, todos os procedimentos operacionais padrões foram validados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de polimorfismos de DNA nuclear de cromossomos autossômicos foi realizado a partir de amostras recolhidas, o que permitiu determinar a partir das amostras questionadas o perfil genético de cada vítima. O LPPGF recebeu dois tipos de amostras biológicas para a identificação humana: tecido ósseo (52,8%) e o tecido muscular (47,2%). Esses valores retratam a seguinte realidade: menos da metade das amostras biológicas recebidas pelo LPPGF estavam conservadas suficientemente para extração de DNA

através de tecido muscular, ao passo que todo o restante, não apresentava essas condições satisfatórias, sendo necessária uma extração mais demorada, através do tecido ósseo. Vale salientar que o LPPGF não obteve problemas no processamento das 125 amostras utilizadas neste estudo.

O fluxo de trabalho do LPPGF inclui a extração de DNA a partir destes dois tipos de amostras biológicas para as amostras questionadas e o esfregaço bucal para as amostras de referência. Tais amostras são encaminhadas ao LPPGF a depender do estado de conservação do cadáver. Todos os métodos moleculares abordados neste artigo foram validados.

Qualquer amostra biológica recolhida na cena do crime pode ser submetida a técnicas de identificação baseadas nas regiões polimórficas do DNA, processo seguro, com alto poder de discriminação e alta confiabilidade, sendo aceita como prova legal em processos judiciais [12]. Quando o corpo está em um estado de decomposição muito avançado, carbonizado ou esqueletizados ou em condições que impedem o uso de impressão digital ou odontologia legal, é necessário analisar o DNA [13].

O FBI (Federal Bureau of Investigation) adota e recomenda um conjunto padrão de loci que são seguidos pelos laboratórios de genética forense em vários países. Durante muitos anos o FBI preconizou que a análise

genética de pelo menos 13 regiões autossômicas e uma sonda para o gene da amelogenina, usado para identificar o sexo, é suficiente para resolver os casos forenses [14]. Mas para garantir uma estatística robusta usamos em nosso estudo 24 marcadores STRs.

Como mostrado na Figura 1, a alta prevalência de casos em aberto (47,2%) alerta a necessidade de implementar melhorias na qualidade e velocidade das investigações policiais. Em outras palavras, as vítimas estão sendo identificadas geneticamente, mas o diagnóstico diferencial de ato criminoso e suas circunstâncias não. O Relatório da Comissão Internacional de Direitos Humanos observou que os casos abertos são absolutamente incompletos e omissos,

e ainda 71% não são encaminhados, levando a lugar nenhum [15].

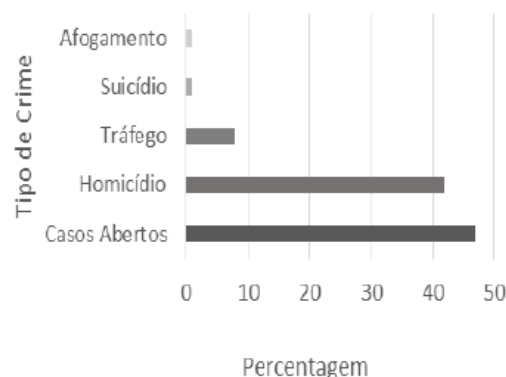


Figura 1. Frequência dos crimes que acometeram as vítimas analisadas pelo LPPGF entre 2012 e 2014.

O crime que mais afeta o estado de Pernambuco é o assassinato (42,4%), tanto na área metropolitana, como no interior, seguido dos acidentes de tráfego (8,8%), e por fim suicídio e afogamento (ambos com 0,8%). Tais dados mostram a necessidade de implementar políticas públicas de combate à violência primária em todo o estado. A percentagem de 77% das vítimas serem do sexo masculino, atacados principalmente no interior de Pernambuco, ajudam a criação de estratégias para

entender as razões e motivações para tal número (Tabela 1). O tráfico de drogas tem sido o principal fator responsável pelo aumento na criminalidade nos últimos anos, sendo o homicídio o crime de maior violência no contexto social [16]. Números da Secretaria de Defesa Social de Pernambuco mostram que no primeiro semestre de 2015, 45% dos homicídios no interior de Pernambuco tiveram ligação direta com o tráfico [17]. Apesar dos esforços da referida Secretaria, o mês de julho de 2015 não teve um bom resultado com o programa social chamado Pacto Pela Vida: depois de dois meses consecutivos de queda, o aumento chegou a 15,6% no número de homicídios [18].

Tabela 1. Parâmetros analisados pelo LPPGF de acordo com os crimes ocorridos em Pernambuco entre 2012-2014.

Parâmetro	Variável	Distribuição	
		n	%
Sexo	Masculino	97	77%
	Feminino	28	33%
Amostra	Osso	66	52,8%
	Músculo	59	47,2%
Área	Metropolitana	60	48%
	Interior	65	52%
Total		125	100%

4. CONCLUSÕES

A abordagem genética para identificação humana, principalmente vítimas de crimes, é uma condição importantíssima para a resolução de qualquer tipo de crime e reduzir ainda mais a agonia vivida por famílias que tiveram seus entes queridos desaparecidos. Ademais, esses resultados podem contribuir para a análise da epidemiologia dos casos de crime em uma escala maior, e ajudará melhor a compreender e gerir a base de dados de DNA local.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense de Pernambuco, que gentilmente permitiu o acesso aos relatórios policiais; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e à Perícia Oficial de Alagoas, que ajudaram na confecção deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] T. Moreti. *Identificação humana: uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina*, 2009.
- [2] R.A. Scoralick, A.A. Barbieri, Z.M. Moraes, J. Franceschini, J. Daruge, S.C.M. Naressi. Human identification through dental radiographs study: case report. *Rev. Odontol. Unesp* **42**(1), 67-71, 2013.
- [3] E.F.A. Silva, G.S. Jacques, G. Chemale, P.A. Francez. *Genética Forense*. Ed. Millenium, 2013.
- [4] T. Dhanardhono, N. Wulandari, S.K.L. Bhima, H.J. Ahmadb, P.T. Widodo. Dna profiling of disaster victim identification in trenggalek shipwreck case. *Forensic Sci. Int. Genet.* **4**(1), e5-e6, 2013.
- [5] J.W. Schumm, C. Gutierrez-Mateo, E. Tan, R. Selden. A 27- locus STR assay to meet all United States and European law enforcement agency standards. *J. Foren. Sci.* **58**(6), 1584-1592, 2013.
- [6] L. Roewer. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Invest. Gen.* **4**, 22, 2013.
- [7] H.B. Ferreira. *Organização gênica de procariotos. Biologia Molecular Básica*. Cap. 4. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2004.
- [8] D.R. Hares. Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.* **6**, e52-e54, 2012.
- [9] C.J. Gershaw, A.J. Schweighardt, L.C. Rourke, M.M. Wallace. Forensic utilization of familial searches in DNA databases. *Forensic Sci. Int. Genet.* **5**(1), 16-20, 2011.
- [10] J.M. Butler. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. *J. Forensic Sci.* **51**(2), 253-265, 2006.
- [11] J.A. Riancho, M.T. Zarrabeitia. PATCAN: a Windows-based software for paternity and sibling analyses. *Forensic Sci. Int.* **135**, 232-234, 2013.
- [12] K. Michelin, J.M. Freitas, G.L. Kortmann. *Locais de crime dos vestígios a dinâmica criminosa*. Campinas. Ed. Milenium, 2013.
- [13] D. Primorac, M.S. Schanfield. Application of forensic DNA testing in the legal system. *Croat. Med. J.* **41**(1), 32-46, 2000.
- [14] J.M. Butler, C.R. Hill. Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. *Forensic Sci. Rev.* **24**(1), 15-26, 2012.
- [15] Bourrier A. *Relatório apela contra extermínio de criança*. Rio de Janeiro: Jornal do Brasil - 29/04/1992.
- [16] M.J.C.S Ferreira. *A relação mediata do tráfico de drogas com a prática do homicídio em Caruaru-PE*. Monografia de conclusão de curso, 2016.
- [17] G1. *Caruaru e região*. Retirado em 20.01.2016, de <http://g1.globo.com/pe/caruaruregiao/noticia/2015/10/mas-de-50-dos-assassinatos-em-caruaru-estao-ligadosoutros-crimes.html>.
- [18] W. Oliveira. *Violência volta a subir em Pernambuco*. Retirado em 08.10.2015, de <http://diariodepernambuco.com.br>.

ARTIGO II - DNA FORENSE APLICADO NA IDENTIFICAÇÃO DE VÍTIMA DE ESQUARTEJAMENTO

DNA FORENSE APLICADO NA IDENTIFICAÇÃO DE VÍTIMA DE ESQUARTEJAMENTO

Marek HF Ekert, Rosana CF Silva, Rafaella AS do Nascimento, Victor P Cavalcante, Alessandro CA Chalegre, Carlos A de Souza, Sandra M Santos, Danyelly BG Martins, José LL Filho

1. Introdução

A identificação humana é necessária para a caracterização do início e do fim da personalidade civil. A morte de um indivíduo precisa ser confirmada, pois com ela extinguem-se o poder familiar, o vínculo conjugal, os contratos personalíssimos, o usufruto e, sem sua confirmação não se inicia o processo de sucessão (SCORALICK et al., 2013). Além disso, a identificação humana constitui-se em um problema de importância jurídica em casos criminais, que demandam necessidade de investigação (SILVA et al., 2013a).

A busca por metodologias confiáveis de identificação humana sempre foi uma grande necessidade social. Em diversas situações, como guerras, distúrbios sócio-políticos e desastres em massa, evidenciam-se a urgência por ações eficazes de identificação das vítimas, objetivando amenizar de alguma forma a angústia social que sempre se instala (DHANARDHONO et al., 2013).

A identificação humana pelo DNA é, na atualidade, considerada crucial para a resolução de situações que envolvam questões criminais, bem como aquelas relacionadas à paternidade e continua revolucionando as áreas jurídicas e criminais (SCHUMM et al., 2013).

A identificação humana pelo DNA é baseada principalmente nas diferenças observadas entre os indivíduos em regiões não codificantes do genoma. Estas diferenças constituem o princípio básico da metodologia usada na Genética Forense (ROEWER, 2013).

No DNA repetitivo são encontradas sequências com repetição em tandem que podem determinar regiões hipervariáveis classificáveis por polimorfismos (FERREIRA, 2004). As principais regiões polimórficas do DNA utilizadas na rotina forense são os *STRs* (*short tandem repeats*) presentes nos cromossomos autossômicos. O tipo e a quantidade mínima de marcadores são validados e sugeridos por renomadas instituições nacionais e internacionais. Quanto maior o número de marcadores, e quanto mais estudada e conhecida a frequência alélica desses marcadores na população

local, maior as chances de sucesso na identificação forense (BUTLER, 2006).

As frequências dos alelos são também importantes para a individualização, uma vez que um alelo do qual a maior parte da população é portadora não se presta à diferenciação de indivíduos. Para cada *locus* polimórfico existem diversos alelos, porém cada indivíduo poderá ter no máximo dois deles, herdados de cada um dos pais. É importante ainda ressaltar que nem todos os *loci* de microsatélites podem ser utilizados nos estudos forenses, sendo os melhores aqueles que se apresentam com maior polimorfismo e mais alto grau de heterozigosidade (BRENNER et al., 1999).

O presente trabalho visou a identificação humana e, dessa forma contribuir para a elucidação de um caso criminal, no qual foram realizados exames de DNA em restos mortais de um cadáver encontrado na cidade de Maceió, Alagoas, Brasil, vítima de crime de esquartejamento.

2. Materiais e Métodos

Em abril de 2015, peritos criminais do Estado de Alagoas, atendendo à uma solicitação de autoridade policial, se deslocaram até o local designado, na cidade de Maceió/AL, e coletaram restos mortais de um cadáver encontrado, do sexo feminino, vítima de esquartejamento, sendo levado para o Instituto Médico Legal de Alagoas, sede Maceió (IML/AL). Com o intuito de se verificar o vínculo genético entre os referidos restos mortais e o suposto filho (P.A.S.L.) da vítima, foram coletadas duas amostras dos restos mortais: a) Fragmento de osso de arco costal (amostra questionada 01 – AQ1); b) Fragmento de osso do úmero (amostra questionada 02 – AQ2); c) Raspado de mucosa bucal do suposto filho da vítima (amostra referência – AR). A amostra de referência só foi coletada após autorização por meio de assinatura no “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE).

As referidas amostras foram levadas para o Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense do Estado de Pernambuco (LPPGF/PE), onde foram realizadas as análises genéticas.

Todas as amostras questionadas foram submetidas à extração de DNA através do método orgânico, enquanto que a amostra de referência teve seu DNA extraído através do DNA IQTM (Promega®). As amostras de DNA total foram quantificadas por *PCR* em Tempo Real, com o emprego do reagente

Quantiflier® Duo DNA Quantification Kit (Life Technologies) e do equipamento 7500 Real Time PCR System (Life Technologies). A amplificação do DNA foi com o emprego do sistema de análise de *loci STRs* Power Plex® Fusion System (Promega Corporation), totalizando 24 (vinte e quatro) *loci* gênicos.

Os produtos de amplificação das amostras foram submetidos à eletroforese capilar em instrumento ABI PRISM 3500HID Genetic Analyzer (Applied Biosystems), sendo analisadas 22 regiões (*loci*) *STR* (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, PENTA E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSFIPO, PENTAD, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D221045), além da amelogenina e do fragmento do cromossomo Y, DYS391, para identificação do gênero sexual.

As análises estatísticas foram realizadas mediante os *softwares*: “Famílias”: para determinação do índice de maternidade (EGELAND et al., 2000); “*Patcan*”: para calcular a probabilidade de duas amostras pertencerem a um mesmo indivíduo (razão de verossimilhança) (RIANCHO & ZARRABEITIA, 2003).

3. Resultados e Discussões

O estudo dos polimorfismos do DNA nuclear dos cromossomos autossômicos nos exames realizados, a partir das amostras coletadas, permitiu determinar a partir das amostras questionadas, os perfis genéticos autossômicos completos.

Toda e qualquer amostra biológica coletada em local de crime poderá ser submetida às técnicas de identificação baseadas nas regiões polimórficas do DNA, processo seguro, com alto poder de discriminação e alta confiabilidade, sendo aceitos como prova legal em casos judiciais (MICHELIN et al., 2013). Quando o corpo está em estado de decomposição muito avançado, carbonizado, esquelizado ou outras situações que impossibilitem a utilização da impressão digital ou odontologia legal, faz-se necessária a análise do DNA (PRIMORAC & SCHANFIELD, 2000).

Os marcadores de maior valor para a identificação humana são aqueles que apresentam alto poder de discriminação (maior que 90%), maior frequência de heterozigotos (maior que 70%), baixa taxa de mutação, menor tamanho e baixa formação de *stutters* (fragmentos de DNA com uma unidade a mais ou a menos que o alelo verdadeiro) (HARES, 2012). Atualmente, a grande maioria das identificações humanas é realizada por meio de marcadores genéticos denominados microsatélites ou *STRs*. Sequências curtas repetidas em tandem no genoma. Os *STRs* geralmente possuem tamanho

entre 2 a 10 pares de bases. Devido ao seu alto poder de discriminação, a análise de *STRs* se tornou rotina em testes de paternidade e genética forense (Chen, 2009). O *FBI* (*Federal Bureau of Investigation*) adota e recomenda uma série padrão de *loci STRs* que são seguidos pelos laboratórios de genética forense em vários países. Durante muitos anos o *FBI* preconizou que a análise genética de no mínimo 13 regiões autossômicas, além de uma sonda adicional para o gene da amelogenina, usado para identificação do sexo, era o suficiente para resolver casos forenses (BUTLER & HILL 2012).

Nas amostras questionadas AQ1(arco costal) e AQ2 (úmero), coletadas do corpo não identificado e do membro superior foi observado um perfil genético de indivíduo do sexo feminino e idênticos entre si, estabelecendo a condição de pertencerem a um único indivíduo (figuras 1 e 2 - dados não publicados).

Uma vez evidenciada a compatibilidade genética e tomando-se por base os valores das frequências alélicas publicadas para a população brasileira efetuou-se cálculos estatísticos objetivando estimar o peso da evidência genética.

Alguns fundamentos da Genética de Populações são utilizados para a realização dos cálculos da frequência esperada do genótipo na população em que pertence as amostras analisadas. Quando muitos marcadores genéticos são analisados, a frequência esperada de um determinado genótipo pode ser muito baixa, como de um indivíduo em alguns milhões e até bilhões, trilhões de indivíduos. Se a frequência esperada do genótipo observado na população for de 1/1.000.000.000, podemos afirmar que a probabilidade de observarmos o mesmo perfil genético em outro indivíduo, não tipado geneticamente e não aparentado ao suspeito é de 1 em 1 bilhão. Quanto menor for a frequência do genótipo obtido, maior será o peso da evidência genética (BUCKLETON et al., 2004).

Nos cálculos estatísticos foram testadas duas probabilidades: (1) as amostras testadas são pertencentes a um mesmo indivíduo; (2) as amostras testadas pertencem a mais de um indivíduo, escolhidos aleatoriamente na população. A análise estatística dos perfis em questão permite estimar que é 22.075.150 (vinte e dois milhões, setenta e cinco mil e cento e cinquenta) vezes mais provável que todas as amostras sejam provenientes de um mesmo indivíduo, do que de indivíduos diferentes, escolhidos aleatoriamente na população.

A partir do perfil genético de indivíduo do sexo feminino encontrado nas 02 (duas) amostras provenientes do cadáver não identificado e do membro superior, nos quais, em todos os *loci*

analisados, foram detectados alelos em comum em relação à amostra referência (AR) do Sr. P.A.S.L. (figura 3 - dados não publicados), estabelecendo a condição de inclusão de maternidade (tabela 1).

SAMPLES	Q51		Q52		RS	
	a1	a2	a1	a2	a1	a2
LOCI	X	X	X	X	X	Y
AMELO						
D3S1358	16	16	16	16	16	17
D1S1656	15	19.3	15	19.3	15	16.3
D2S441	10	11	10	11	10	14
D10S1248	11	13	11	13	13	14
D13S317	10	12	10	12	11	12
PENTA E	12	12	12	12	7	12
D16S539	11	11	11	11	11	13
D18S51	16	17	16	17	13	16
D2S1338	17	19	17	19	17	19
CSF1PO	10	11	10	11	11	11
PENTA D	10	12	10	12	9	12
TH01	8	9.3	8	9.3	8	8
VWA	15	17	15	17	15	16
D21S11	30	32	30	32	30	32.2
D7S820	8	11	8	11	11	11
D5S818	11	11	11	11	11	13
TPOX	9	11	9	11	8	9
DYS391						
D8S1179	13	14	13	14	13	14
D12S391	20	20	20	20	20	22
D19S433	14	15.2	14	15.2	11	15.2
FGA	22	22	22	22	20	22
D22S1045	10	16	10	16	15	16

Uma vez evidenciada a compatibilidade de vínculo genético e tomando-se por base os valores das frequências alélicas publicadas para a população brasileira, efetuou-se cálculos estatísticos objetivando estimar o peso da evidência genética. Nos referidos cálculos foram testadas duas possibilidades: (1) o cadáver de identidade desconhecida, com seu correspondente membro superior é da mãe biológica de P.A.S.L.; (2) a mãe biológica de P.A.S.L. é outra pessoa escolhida aleatoriamente na população. A análise estatística dos perfis genéticos em questão permitiu estimar que é de 416.146 (quatrocentos e dezesseis mil, cento e quarenta e seis) vezes mais provável que o cadáver de identidade desconhecida seja da mãe biológica de P.A.S.L., do que de outra pessoa escolhida aleatoriamente na população.

4. Conclusões

O cadáver não identificado (AQ1) e o membro superior (AQ2) não estão excluídos de pertencer a um mesmo indivíduo. O perfil genético obtido das amostras biológicas coletadas no cadáver não identificado não está excluído de ser da mãe biológica de P.A.S.L. Tais conclusões são apoiadas de maneira extremamente forte pelas análises estatísticas realizadas.

A abordagem genética para identificação humana é condição *sine qua non* para a resolução de casos criminais de esquartejamento. Sugere-se a caracterização genética da população de Alagoas e de outras populações da região nordeste, de modo a minimizar possíveis erros decorrentes de sub-estruturação populacional.

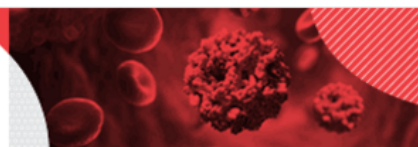
Referências

- BUCKLETON JS, TRIGGS CM, WALSH SJ (2004) Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press.
- BUTLER JM (2006) Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. J Forensic Sci 51:2.
- BUTLER JM, HILL CR (2012) Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. Forensic Sci. Rev 24:15.
- CHEN DP, TSENG CP, TSAI SH, WANG MC, LU SC, WU TL, CHANG PY, SUN CF (2009) Use of X-linked short tandem repeats loci to confirm mutations in parentage caseworks. Clin Chim Acta 408:29-33.
- DHANARDHONO T, WULANDARI N, BHIMASKL, AHMADB HJ, WIDODO PT (2013) DNA profiling of disaster victim identification in Trenggalek shipwreck case. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 4:5-6.
- EGELAND T, MOSTAD P, MEGAV B, STENERSEN M (2000) : "Beyond traditional paternity and identification cases. Selecting the most probable pedigree." Forensic Science International Vol 110, Nr. 1.
- FERREIRA HB (1996) Organização gênica de procaríotes. Biologia Molecular Básica. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. Cap.4.
- FRUMKIN D, WASSERSTROM A, DAVIDSON A, GRAFIT A (2009) Authentication of forensic DNA samples. Forensic Sci Int: Genetics.
- GERSHAW CJ, SCHWEIGHARDT AJ, ROURKE LC, WALLACE MM (2011) Forensic utilization of familial searches in DNA databases. Forensic Sci Int: Genet 16-20.
- GUIMARÃES MA, SOARES-VIEIRA JA, SILVARHA, EVISON MP (2009) A standard procedure for accommodating forensic anthropological and genetic analysis of decomposing human remains from tropical climates. Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series 2:165-166.
- HARES DR (2012) Expanding the CODIS core loci in the United States. Forensic Sci Int Genet 6: e52-e54. International Criminal Police Organization. Interpol DVI Guide. Lyon: OIPC - Interpol; 2009. Disponível em: <http://www.interpol.int/INTERPOL-expertise/Forensics/DVI-Pages/DVI-guide>. Acesso em 05/02/2014.
- JEFFREYS AJ, BROOKFIELD JFY, SEMEONOFF R (1985a) Positive Identification of an Immigration Test-Case Using Human DNA Fingerprints. Nature 317:818 - 819 ROEWER L (2013) DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. Invest Gen 4:22.
- JOBIM LF, JOBIM MR, BRENNER C (1999) Identificação humana pelo DNA: Investigação de paternidade e análise de casos forenses. TORCHETTO D. Identificação humana. Porto Alegre: Sagra-Luzzatto. Parte IV.
- MICHELIN K, FREITAS JM, KORTMANN GL (2013) Locais de Crime dos Vestígios a Dinâmica Criminosa. Campinas. Milenium.
- MORETI T (2009) Identificação humana: Uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina.
- PRIMORAC D, SCHANFIELD MS (2000) Application of forensic DNA testing in the legal system. Croatian Medical Journal 41(1):32-46.
- RIANCHO JA, ZARRABEITIA MT (2003) PATCAN: a Windows-based software for paternity and sibling analyses. Forensic Sci. Int. 135: 232- 34.
- SCHUMM JW, GUTIERREZ-MATEO C, TAN E, SELDEN R (2013) A 27-Locus STR Assay to Meet All United States and European Law Enforcement Agency Standards. J Forensic Sci 58:6.
- SCORALICK RA, BARBIERIAA, MORAES ZM, FRANCESQUINI JÚNIOR L, DARUGE JÚNIOR, NARESSI SCM (2013) Human identification through dental radiographs study: case report. Rev. odontol. UNESP 42:1.
- SILVA EFA, JACQUES GS, CHEMALE G, FRANCEZ PA (2013a) Genética Forense. Milenium.
- ZIETKIEWICZ E, WITT M, DACA P, ZEBRACKA-GALA J (2012) Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. J. Appl. Genet. 53: 41-60.

**ARTIGO III - ABSENCE OF POLYMORPHISM IN TLR2 GENE AS A
PROTECT FACTOR AGAINST HPV INFECTION IN WOMEN WITH
BACTERIAL VAGINOSIS.**

Artigo a ser submetido para

JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY
The full breadth of clinical microbiology



**Absence of polymorphism in TLR2 gene as a protect factor against HPV
infection in women with bacterial vaginosis.**

Ekert MHF^a, Coelho-Silva JL^a, Melo AL^a, Monteiro BGQ^a, Martins DAP^a, Neves CB^a,
Lima-Silva HY^a, Lima-Filho JL^{a,b}, Araújo RFF^{a,b}, Martins DBG^{a,b,*}

^aLaboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

^bDepartment of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

* Corresponding author:

Danyelly Bruneska Gondim Martins

Laboratory of Immunopathology Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 (81)

2126-8484; Fax: +55 (81) 2126-8000

e-mail: bruneska@prospecmol.org

Abstract

In cervical cancer, mainly caused by HPV infection other sexually transmitted agents have been proposed to contribute, as Bacterial vaginosis (BV). The efficiency of TLR2 signaling pathways can be affected by single nucleotide polymorphisms (SNPs), influencing normal cellular immune response contributing for inflammation and cancer. The present study aimed to evaluate the role of *-196 to -174 del* TLR2 in women infected by HPV and BV. A cross-sectional study was carried out with 234 women attended in material in public health center in Olinda, Pernambuco, Brazil. Cervical samples were collected for Papanicolaou test. Residual cells in the brush were stored into PBS buffer for molecular biology analysis. Patients found to be wild-type for TLR2 *-196 to -174 del* is important for avoiding HPV infection, when present bacterial vaginosis ($p < 0.05$; O.R = 0.9458). However, further studies are required to explore the role of TLR polymorphisms in the risk of HPV infection associated to cytokines levels and immune cells recruitment in this tissue.

Key words: HPV infection, Bacterial vaginosis, TLR2.

The epithelial mucosa of the reproductive tract provides the first line of defense against many pathogens invasion, which requires a tissue injury prior to achieving the basal cell layer and install the infection and malignant progression (Garcia-Chacon *et al.*, 2009). The Toll-like receptors (TLRs) family of transmembrane receptors plays a fundamental role in recognizing of immunogenic fragments of pathogenic microorganisms (PAMPs) and activation of innate immunity. Nowadays, eleven human TLR types (TLR1 to TLR11) have been described as able to recognize molecules for multiple pathogens, including bacteria, viruses, fungi, and parasites (Akira *et al.*, 2006; Kawai & Akira, 2010).

The efficiency of TLR2 signaling pathways can be affected by single nucleotide polymorphisms (SNPs), influencing normal cellular immune response contributing for inflammation and cancer. The -196 to -174 del TLR2 polymorphism has been related with the development of diseases caused by virus (Azeredo *et al.*, 2010), and cancers (Wang *et al.*, 2013). In cervical cancer, mainly caused by HPV infection (Hausen, 2002), the fourth most commonly diagnosed cancer and the fourth leading cause of cancer death in females worldwide (Ferlay *et al.*, 2010), (Torre *et al.*, 2015). However, the trigger from cellular lesion to cervical cancer is not well established, and the role of the immune system in triggering is still unclear.

Other sexually transmitted agents have been proposed to contribute cervical susceptibility to HPV infection and carcinogenesis (Klomp *et al.*, 2008). Bacterial vaginosis (BV) also contributes to this process through the shift from the protective *Lactobacillus* predominant vaginal flora to an overgrowth of anaerobic bacterias, including *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* species, and *Prevotella* species (Shim *et al.*, 2010). This BV is characterized by a malodorous, homogenous, grayish-white

vaginal discharge, vaginal pH 4.5, and a fishy odor(Weir, 2004), although BV has not been shown to be associated with cervical intraepithelial neoplasia (CIN)(Peters *et al.*, 1995). The present study aimed to evaluate the role of *-196 to -174 del* TLR2 in women infected by HPV and BV.

A cross-sectional study was carried out with 234 women attended in material in public health center in Olinda, Pernambuco, Brazil, from April to June 2011. Cervical samples were collected for Papanicolaou test. Residual cells in the brush were stored into PBS buffer for molecular biology analysis. All patients informed written consent for participating in the study (CEP/CCS/UFPE No.275/08). Cytopathology results were categorized using the Bethesda system of nomenclature (Solomon and Nayar, 2004), as follows: negative for intraepithelial lesion or malignancy; atypical squamous cells of undetermined significance; and low- and high-grade squamous intraepithelial lesions. According to the Bethesda system nomenclature, the presence of small coccobacilli coating the surface of squamous cells (clue cells) besides the absence of lactobacillus were indicative of flora alteration and therefore suggestive of Bacterial vaginosis (BV). The final cytological diagnoses were confirmed by the consensus of two independent pathologists. Genomic DNA was extracted from cervical squamous cells samples using the Wizard® Genomic SV Kit (Promega, USA). DNA eluted was submitted to PCR for β -globin [21] and HPV L1 gene using MY09/11 (Manos *et al.*, 1998) and GP5⁺/6⁺ (de Roda Husman *et al.*, 1995). TLR2 (*-196 to -174 del*) polymorphism was evaluated in all samples (Tahara *et al.*, 2007). PCR reactions were performed with GoTaq Green Master Mix (Promega, USA), using 10pmol of each primer and 1.0 μ l of DNA (up to 100ng). The amplicon was analysed by electrophoresis in 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide (EtBr), under ultraviolet light. Genotype analysis followed the amplicon sizes: 286bp wild type, 264bp

homozygous mutant, and heterozygous (286bp and 264bp) genotype (**Figure 1A**). PCR reactions were performed with GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA), using 10pmol of each primer and 1.0µl of DNA (up to 100ng). pBR322.HPV16 was used as a positive control and ultrapure water was used as a negative control. The amplicons were visualized by electrophoresis in 1.0 % agarose gel, stained with ethidium bromide (EtBr), under ultraviolet light. Amplicon obtained from TLR2 evaluation were applied to the sequencing analysis using MegaBACE 750 Sequencing System (GE Life Science). The raw data was evaluated in *CLC Main Workbench 5.7.1* (CLC Bio, USA) (**Figure 1B**). The statistical analysis software used was Prism 7 (GraphPad), and $p < 0.05$ was considered statistically significant.

TLR2 -196 to -174 del wild-type was the most prevalent pattern in the studied population with 74.5% in cervical samples. A total of 51 patients (21.80%) were infected by HPV, which 13 patients (25.49%) carried the mutation; while 42 patients (22.95%) carried the mutation in the HPV-negative group of cervical samples (**Table 1**). Patients found to be wild-type for TLR2 -196 to -174 del is important for avoiding HPV infection, when present bacterial vaginosis ($p < 0.05$; O.R = 0.9458). On the other hand, patients who presented a deletion in at least one of the total *loci* showed increased susceptibility for HPV infection (**Table 2**). No statistical correlation was observed between TLR2 (-196 to -174) polymorphism and BV proliferation (**Table 3**).

TLR2 seems to have an overall protective role in several viruses infections (Gutzeit *et al.*, 2010) (Chang *et al.*, 2007), however, there is no consistent information concerning the role of TLR2 in the HPV infection. TLR2 *del* allele showed significant association with cervical cancer susceptibility (Pandey *et al.*, 2009), but our data show no correlation with HPV infection and cervical cancer, as Tunisian and Indonesian studies (Panigoro *et al.*,

2013). One may suggest that this different result might be caused by diversities in the different types of TLR distribution in epithelia, once TLR2 is expressed on the cervical epithelium surface and also presents in active pouchitis and keratinocytes (Zhou *et al.*, 2013). On the other hand, this can also be attributed to sample size, also to differences in ethnic origin.

Although it is reported that TLR2 stimulates the production of interleukins, interferon, stimulate NK cells, promote CD8 T cell survival, cloning expansion and memory cell establishment (Martinez *et al.*, 2010; Quigley *et al.*, 2009), it seems that TLR2 is not activated against HPV infection once in patients with squamous intraepithelial lesion high grade showed reduced T helper type 1 response with low levels of IFN- γ and TNF- α (Lee *et al.*, 2004). Otherwise, hemolysin (Gvh) specific antigen against BV increases the levels of proinflammatory cytokines, such as interleukin IL-1 and IL-8, also linked to HPV-related diseases (Cauci *et al.*, 2002; Sturm Ramirez *et al.*, 2000). Then it is possible that previous infection with BV lead to IL-1 and IL-8 production, reflecting in a protective effect against HPV infection.

Our results showed suggest that the integrity in the promoter sequence of TLR2 is important for avoiding HPV infection, when this signaling is previously stimulated through bacterial vaginosis. However, further studies are required to explore the role of TLR polymorphisms in the risk of HPV infection associated to cytokines levels and immune cells recruitment in this tissue. The evaluation of increased number of subjects with complete medical record data and biopsy immunochemical studies can improve the results quality.

Acknowledgments

The authors thank City Hall Olinda for partnership, and FACEPE and CNPq for financial support.

References

- Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006).** Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **124**, 783–801.
- Azeredo, E. L., Neves-Souza, P. C., Alvarenga, A. R., Reis, S. R. N. I., Torrentes-Carvalho, A., Zagne, S.-M. O., Nogueira, R. M. R., Oliveira-Pinto, L. M. & Kubelka, C. F. (2010).** Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* **130**, 202–216.
- Cauci, S., Guaschino, S., Driussi, S., De Santo, D., Lanzafame, P. & Quadrifoglio, F. (2002).** Correlation of local interleukin-8 with immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and with prolidase and sialidase levels in women with bacterial vaginosis. *J INFECT DIS* **185**, 1614–1620.
- Chang, S., Dolganiuc, A. & Szabo, G. (2007).** Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *Journal of Leukocyte Biology* **82**, 479–487.
- de Roda Husman, A. M., Walboomers, J. M., van den Brule, A. J., Meijer, C. J. & Snijders, P. J. (1995).** The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* **76 (Pt 4)**, 1057–1062.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**, 2893–2917.

Garcia-Chacon, R., Velasco-Ramirez, S. F., Flores-Romo, L. & Daneri-Navarro, A. (2009). Immunobiology of HPV Infection. *Archives of Medical Research* **40**, 443–448. IMSS.

Gutzeit, C., Raftery, M. J. & Peiser, M. (2010). Identification of an important immunological difference between virulent varicella-zoster virus and its avirulent vaccine: viral disruption of dendritic cell instruction. *The Journal of Immunology*.

Hausen, zur, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Immunology* **2**, 342–350.

Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373–384.

Klomp, J. M., Boon, M. E., Van Haaften, M. & Heintz, A. P. M. (2008). Cytologically diagnosed Gardnerella vaginalis infection and cervical (pre)neoplasia as established in population-based cervical screening. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **199**, 480.e1–480.e5.

Lee, B.-N., Follen, M., Shen, D.-Y., Malpica, A., Adler-Storthz, K., Shearer, W. T. & Reuben, J. M. (2004). Depressed Type 1 Cytokine Synthesis by Superantigen-Activated CD4⁺ T Cells of Women with Human Papillomavirus-Related High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions. *Clinical and*

Manos, R. M. M., Bauer, H. M. & Greer, C. E. (1998). Detection of human papillomavirus by the polymerase chain reaction using specific L1, and E6 probes 1–37.

Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. (2010). Direct TLR2 Signaling Is Critical for NK Cell Activation and Function in Response to Vaccinia Viral Infection. *PLoS Pathog* **6**, e1000811 (L. J. Sigal, Ed.).

Pandey, S., Mittal, R. D., Srivastava, M., Srivastava, K., Singh, S., Srivastava, S. & Mittal, B. (2009). Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (-196 to -174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. *Gynecologic Oncology* **114**, 501–505.

Panigoro, R., Susanto, H., Arrazeen, M. N., Tobing, M., Maskoen, A. M. & Sahiratmadja, E. (2013). Exploring TLR2 Gene Polymorphisms in Cervical Cancer Development. *mkb* **45**, 257–262.

Peters, N., Van Leeuwen, A. M., Pieters, W. J., Hollema, H., Quint, W. G. & Burger, M. P. (1995). Bacterial vaginosis is not important in the etiology of cervical neoplasia: a survey on women with dyskaryotic smears. *Sex Transm Dis* **22**, 296–302.

Quigley, M., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. (2009). A critical role for direct TLR2-MyD88 signaling in CD8 T-cell clonal expansion and memory formation following vaccinia viral infection. *Blood* **113**, 2256–2264.

Shim, H.-S., Noh, S., Park, A.-R., Lee, Y.-N., Kim, J.-K., Chung, H.-J., Kang, K.-S. & Cho, N. H. (2010). Detection of sexually transmitted infection and human papillomavirus in negative cytology by multiplex-PCR. *BMC Infect Dis* **10**, 110.

Sturm Ramirez, K., Gaye Diallo, A., Eisen, G., Mboup, S. & Kanki, P. J. (2000). High Levels of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β in Bacterial Vaginosis May Increase Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus. *J INFECT DIS* **182**, 467–473.

Tahara, T., Arisawa, T., Wang, F. & Shibata, T. (2007). Toll-like receptor 2–196 to 174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. *Cancer Science*.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J. & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**, 87–108.

Wang, X.-Q., Liu, L., Liu, Y. & Zhang, K. (2013). TLR-2 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Cancer: Evidence from Meta-Analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* **17**, 864–872.

Weir, E. (2004). Bacterial vaginosis: more questions than answers. *Canadian Medical Association Journal* **171**, 448–448.

Zhou, Q., Zhu, K. & Cheng, H. (2013). Toll-like receptors in human papillomavirus infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**, 203–215.

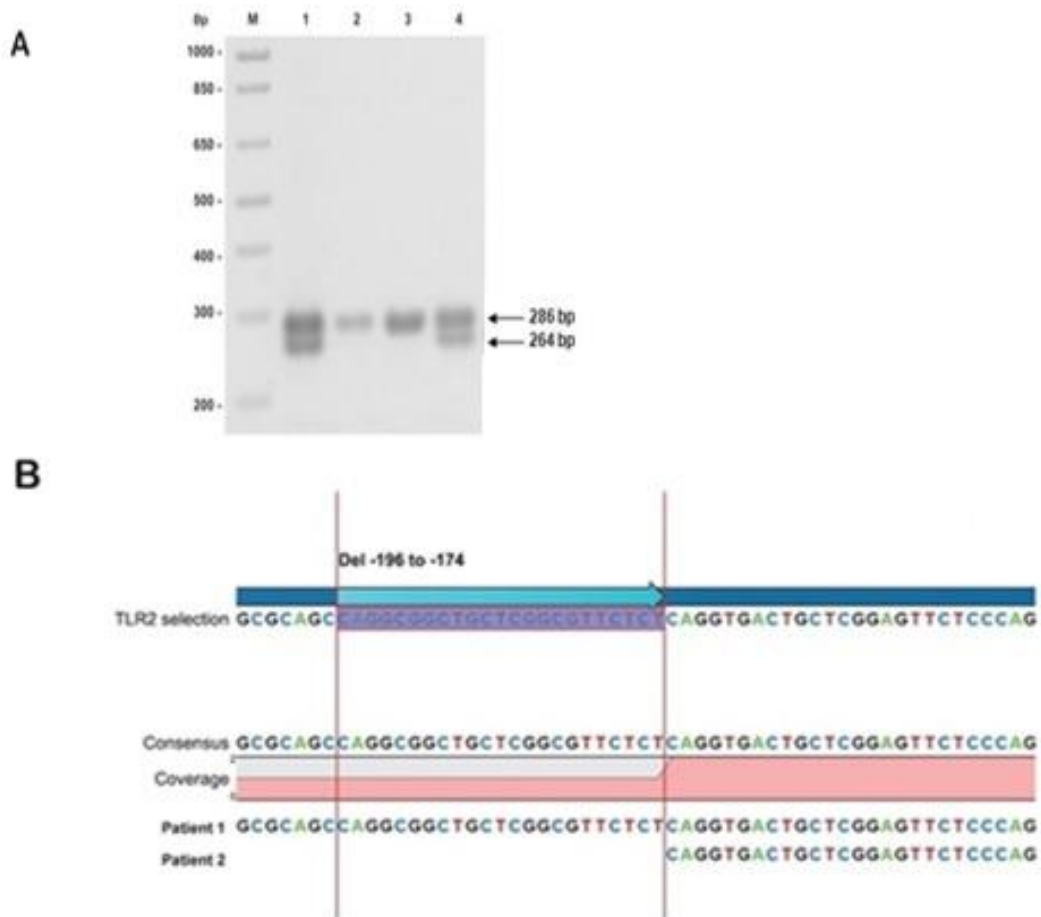


Figure 1. Sequence analysis and gel electrophoresis patterns of TLR2 polymorphisms. **A:** PCR bands for heterozygous and wild-type patients. **B:** Sequencing data from two patients showing the deletion of 22 base pairs in TLR2 promoter.

Table 1. Polymorphic profile of TLR2 gene in cervical samples in women of Olinda – Brazil.

HPV infection	Number of Patients	TLR2 (–196 to –174 del) polymorphism			<i>p-value</i>	OR (95%CI)
		Wild-type	Heterozygous	Mutant		
Yes	51 (21.80%)	39 (75%)	11 (21.15%)	2 (3.85%)	0.853	0.9218 (0.4397 to 1.842)
No	183 (77.88%)	140 (76.50%)	32 (17.48%)	10 (5.47%)		

Table 2. Association of TLR gene polymorphisms with HPV infection among patient with bacterial vaginosis.

BV (+) n = 74	HPV (+) n = 17	HPV (-) n = 57	p	O.R (95% CI)
wt/wt	11	48	<0.05	0.9458
wt/del	6	8		(0.04254 to 0.2103)
del/del	0	1		

Table 3. Association between BV and TLR2 polymorphism.

Sample	Bacterial vaginosis	Normal microflora	<i>p</i>	O.R (95% CI)
Wild-type	59	120		Reference
Heterozygous	14	29	>0.999	1.018 (0.5156 to 2.123)
Mutant	1	11	0.1079	5.408 (0.9194 to 59.3)

**ARTIGO IV - EVALUATION OF IRF3 (S427T) POLYMORPHISM
AND SUSCEPTIBILITY TO HUMAN PAPILLOMAVIRUS
INFECTION.**

Artigo a ser submetido para Immunogenetics



Evaluation of IRF3 (S427T) polymorphism and susceptibility to human papillomavirus infection.

Ekert MHF^{a,b}, Cunha JEG^a, Araújo RFF^{a,c}, Rocha CC^{a,c}, Martins DBG^{a,c*}, Lima-Filho JL^{a,c}

^aLaboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

^bInstitute of Criminalistics, Official Expertise of Alagoas.

^cDepartment of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

* Corresponding author:

Marek Henryque Ferreira Ekert

Laboratory of Immunopathology Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 (81) 2126-8484; Fax: +55 (81) 2126-8000

e-mail: bruneska@prospecmol.org

Abstract

The IRF3 is a key mediator in the TLR signaling pathway as response to the dsRNA and LPS, respectively. Therefore, IRF3 binds to the interferon- β (*IFN- β*) promoter region after forming a stable complex with other transcriptional regulators. The IRF3 S427T polymorphism was associated to viral infections, including persistence of HPV. The purpose of this brief was to investigate the frequency of the S427T polymorphism in cervical samples from 55 patients. In our population no association was found between S427T and HPV infection or Bacterial Vaginosis presence and further studies should be performed to determine the contribution of this molecule in the immune response against HPV and cancer development.

Key words: IRF3, HPV infection, bacterial vaginosis.

Cervical cancer is the fourth most common cancer in women and the seventh most common cancer overall. A large majority (around 85%) of the global burden occurs in the less developed regions, and almost 9 in 10 patients die due to the cervical cancer (Torre et al. 2015).

Human papillomavirus (HPV) is the etiological agent of hyperproliferative lesions and warts in skin, genital organs, and the upper respiratory tract (Hausen 2002). There are around 40 high-risk HPV (hrHPV) genotypes that can be found in 99% of cervical cancers, but HPV16 and 18 account for 75% and 15% of the total cervical cancer, respectively (Tummers and Burg 2015).

The HPV replicative cycle is tied to the keratinocyte differentiation programme, and several factors minimize or prevent exposure of virus to the immune system. HPV16 E7 protein blocks IFN- α activity, by inhibiting the induction of the IFN- α inducible genes; and inhibits the activation of the IFN- β promoter. Data obtained from animal studies also indicate that a defective immune response is one such cofactor in the progression of HPV-associated disease (Tindle 2002).

The induction of type I IFNs is triggered by pattern recognition receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PRRs are involved in the induction of type I IFNs, divided into two categories: Toll-like receptors (TLRs) and RIG-I-like helicases (RLHs). TLRs are located on cell surfaces or in endosomes, where they

detect viral components or viral nucleic acid (Uematsu and Akira 2007). These molecules activated by PAMPs, and recruit several adaptor proteins, signaling a pathway for stimulating Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) and Interferon Regulatory Factors (IRF) signaling. Thus, leading to the expression of type I Interferons, INF- α and INF- β , together with the production of cytokines and activation of Natural Killer cells (Guerrero and Acosta 2016).

The IRF3 is a key mediator in the TLR3 and TLR4 signaling pathway as response to the dsRNA and lipopolysaccharide (LPS), respectively. Therefore, IRF3 binds to the interferon- β (*IFN- β*) promoter region after forming a stable complex with other transcriptional regulators (Doyle et al. 2002; Mancino and Natoli 2016). Some virus infections have been associated with IRF3 polymorphism, like influenza A virus (Kuo et al. 2010), bovine herpesvirus type 1 (da Silva et al. 2011) and Zika virus (Yockey et al. 2016). Although HPV is a DNA virus, the single-base polymorphism (SNP) S427T, located on exon 8 of the IRF3 gene, has already been associated with persistence of HPV infection and progression from cervical lesions to cancer in population of Costa Rica (Wang et al. 2009).

In this context, the aim of this study was to investigate the frequency of the IRF3 S427T polymorphism in cervical samples from HPV-infected women from Pernambuco, Brazil. Therefore, molecular tests were performed in cervical samples from 55 patients from a primary health care, from Olinda-Pernambuco, Brazil. HPV genotyping was performed in PapilloCheck® system. The IRF3 S427T polymorphism was evaluated through sequencing of 415bp fragment in MegaBACE 75 (GE HealthCare), using DYEnamic™ ET Dye Terminator kit, according to manufacturer instructions.

HPV was present in 29 samples (52.7%), but HPV genotyping efficiency rate was 63.6%, resulting in 18 HPV-positive and seven HPV-negative samples. This can occur because the Papillocheck detects 24 viral genotypes, while it is known that there are more

than 150. HPV6 was the most frequent followed by HPV16, with 33.3% and 16.7%, respectively. Five patients showed multiple infections with up to 3 HPV genotypes. Forty-nine samples were successfully evaluated for IRF3 polymorphism, which 23 wild-type (46.9%), 23 mutant (46.9%) and only 3 heterozygous (6.1%). The genotype frequencies were according to HWE ($p = 0.379$).

Among the 18 HPV positive samples, mutant genotype was the most prevalent (50%) followed by wild-type (33.33%) and heterozygous (16.66%). On the other hand, in the negative samples group mutant IRF3 was the most prevalent (51.61%), and heterozygous was absent (Table 1).

Once IRF3 can be involved in TLR4 pathway, the frequency of IRF3 S427T polymorphism was evaluated in samples for bacterial infection. A total of 13 wild-type and 6 mutant genotype samples were identified with Bacterial Vaginosis.

Our findings show higher frequency of mutant genotype associated to HPV infection, compared to the study performed in Costa Rica that reported 21% mutant genotype patients with persistent HPV infection (Wang et al. 2009). Although there are no studies relating IRF3 S427T polymorphism to bacteria, an intronic mutation in IRF3 was reported to affect the resistance against *Listeria monocytogenes* in mice (Garifulin et al. 2007).

The population studied did not show S427T association with susceptibility to HPV infection or bacterial vaginosis. Further studies should be performed improving the samples number and variety to determine the contribution of this molecule in the immune response against HPV and cancer development.

REFERENCES

da Silva LF, Gaudreault N, Jones C (2011) Cytoplasmic localized infected cell protein 0 (bICP0) encoded by bovine herpesvirus 1 inhibits β interferon promoter activity and reduces IRF3 (interferon response factor 3) protein levels.

Doyle SE, Vaidya SA, O'Connell R, Dadgostar H (2002) IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program.

Garifulin O, Qi Z, Shen H, et al (2007) Irf3 Polymorphism Alters Induction of Interferon Beta in Response to *Listeria monocytogenes* Infection. *PLOS Genetics* 3:e152. doi: 10.1371/journal.pgen.0030152

Guerrero CA, Acosta O (2016) Inflammatory and oxidative stress in rotavirus infection. *WJV* 5:38. doi: 10.5501/wjv.v5.i2.38

Hausen zur H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Immunology* 2:342–350. doi: 10.1038/nrc798

Kuo R-L, Zhao C, Malur M, Krug RM (2010) Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation of IRF3 and interferon- β transcription. *Virology* 408:146–158. doi: 10.1016/j.virol.2010.09.012

Mancino A, Natoli G (2016) Specificity and Function of IRF Family Transcription Factors: Insights from Genomics. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 36:462–469. doi: 10.1089/jir.2016.0004

Tindle RW (2002) Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nature Reviews Immunology* 2:59–65. doi: 10.1038/nrc700

Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108. doi: 10.3322/caac.21262

Tummers B, Burg S (2015) High-Risk Human Papillomavirus Targets Crossroads in Immune Signaling. *Viruses* 7:2485–2506. doi: 10.3390/v7052485

Uematsu S, Akira S (2007) Toll-like Receptors and Type I Interferons. *J Biol Chem* 282:15319–15323. doi: 10.1074/jbc.R700009200

Wang SS, Bratti MC, Rodríguez AC, et al (2009) Common variants in immune and DNA repair genes and risk for human papillomavirus persistence and progression to cervical cancer. *J INFECT DIS* 199:20–30. doi: 10.1086/595563

Yockey LJ, Varela L, Rakib T, et al (2016) Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. *Cell* 166:1247–1256.e4. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.004

Table 1. Association between IRF3 S427T polymorphism and HPV infection.

IRF3	HPV positive	HPV Negative
Genotypes		
AA	6 (33.33%)	16 (51.61%)
AB	3 (16.66%)	0
BB	9 (50%)	15 (48.39%)

4 CONCLUSÕES

Através dos marcadores STR, foi possível realizar, com êxito, a identificação de 125 vítimas de crimes no estado de Pernambuco. Ademais, mediante esses marcadores genéticos, elucidou-se um caso de homicídio, que gerou grande repercussão no estado de Alagoas, no qual identificou-se uma vítima de esquartejamento.

O contexto social atual obriga por parte do governo, profissionais de segurança pública e cientistas, uma busca constante por alternativas e metodologias cada vez mais eficientes que permitam identificar criminalmente as vítimas e os autores dos ilícitos penais.

A integridade genômica do TLR2 é importante para evitar a infecção pelo HPV, quando esta sinalização é previamente estimulada através de vaginose bacteriana. Por outro lado, a população estudada não mostrou associação do polimorfismo S427T no gene IRF3 com susceptibilidade à infecção pelo HPV ou vaginose bacteriana.

Por conseguinte, estudos adicionais são necessários para explorar o papel dos polimorfismos das TLRs, principalmente a TLR2 e, também das moléculas de suas cascatas de ativação imunológica, especialmente o IRF3, no risco de infecção pelo HPV associado com níveis de citocinas e recrutamento celular imune neste tecido. Dessa forma, pode-se tentar elucidar o papel dessas moléculas na resposta imune contra HPV.

**APÊNDICE A – ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR FOR BOVINE
PAPILLOMAVIRUS DETECTION USING POLYMERIC FILM ON SCREEN-
PRINTED ELECTRODE**



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bios

Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode

Gustavo A. Nascimento^{a,*}, Elaine V.M. Souza^a, Danielly S. Campos-Ferreira^a, Mariana S. Arruda^a, Carlos H.M. Castelletti^{a,b}, Marcela S.O. Wanderley^a, Marek H.F. Ekert^a, Danyelly Bruneska^{a,c}, José L. Lima-Filho^{a,c}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Av. General San Martín, 1371, Bongi, 50761-000, Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2012

Received in revised form

28 April 2012

Accepted 30 April 2012

Available online 31 May 2012

Keywords:

Bovine papillomavirus

Electrochemical DNA biosensor

Screen-printed electrode

ABSTRACT

A new electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus (BPV) detection that was based on screen-printed electrodes was comprehensively studied by electrochemical methods of cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV). A BPV probe was immobilised on a working electrode (gold) modified with a polymeric film of poly-L-lysine (PLL) and chitosan. The experimental design was carried out to evaluate the influence of polymers, probe concentration (BPV probe) and immobilisation time on the electrochemical reduction of methylene blue (MB). The polymer poly-L-lysine (PLL), a probe concentration of 1 μ M and an immobilisation time of 60 min showed the best result for the BPV probe immobilisation. With the hybridisation of a complementary target sequence (BPV target), the electrochemical signal decreased compared to a BPV probe immobilised on the modified PLL-gold electrode. Viral DNA that was extracted from cattle with papillomatosis also showed a decrease in the MB electrochemical reduction, which suggested that the decreased electrochemical signal corresponded to a bovine papillomavirus infection. The hybridisation specificity experiments further indicated that the biosensor could discriminate the complementary sequence from the non-complementary sequence. Thus, the results showed that the development of analytical devices, such as a biosensor, could assist in the rapid and efficient detection of bovine papillomavirus DNA and help in the prevention and treatment of papillomatosis in cattle.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bovine papillomatosis is an infectious disease caused by a double-stranded DNA virus, bovine papillomavirus (BPV) (Campo, 2006; Claus et al., 2008). This virus can induce lesions in the stratified squamous epithelium of the skin and mucous membranes and fibroepithelial tumours (Antonsson and Hansson, 2002; Campo, 2002; Yuan et al., 2010). The BPV belong to the *Papillomaviridae* family, which contains 16 genera (Antonsson and Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004). Ten types (BPV1–10) have been well characterised by studies on their biology and genome homology (Claus et al., 2009; Nasir and Campo, 2008). In general, three primers, MY09/MY11, GP5+/GP6+ and FAP59/FAP64, are widely used for papillomavirus identification in humans (first two pairs) and in bovine and other animals (last pair) (Lee et al., 2010; Rai et al., 2011). Research into BPV diagnostics has attracted

considerable interest due to problems in the infected animals, such as dermatitis and cancer in different body sites (Borzacchiello and Roperto, 2008; Brandt et al., 2011; Campo, 2002). Consequently, these problems can contribute to economic losses in the agricultural industry. Currently, BPV diagnosis has been made through histological observations of skin and tissues. These models often do not lead to conclusive results and consequently produce a slow diagnosis.

Electrochemical DNA biosensor technologies have been developed due to their several advantages, such as specificity, selectivity, low cost, rapid diagnosis and the possibility of miniaturisation (Siddiquee et al., 2010). A DNA biosensor or genosensor recognises a complementary sequence (target) to a single-stranded DNA (probe) (Labuda et al., 2010; Souza et al., 2011). For a DNA hybridisation sensor, a probe with a defined nucleotide sequence is immobilised on a conductive surface by using immobilisation methods, such as adsorption, cross-linking, encapsulation, an avidin-biotin complex or a covalent attachment (Wang et al., 2008). The key for manufacturing a DNA biosensor is the oligonucleotide immobilisation on different types of transducer surfaces (Wang et al., 2010). Many polymers have been used in

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8484; fax: +55 81 2126 8485.
E-mail address: galvesn23@gmail.com (G.A. Nascimento).

**APÊNDICE B – ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR FOR HUMAN
PAPILLOMAVIRUS 16 DETECTION IN REAL SAMPLES**



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples



Danielly S. Campos-Ferreira^{a,*}, Gustavo A. Nascimento^a, Elaine V.M. Souza^{a,c},
Maria A. Souto-Maior^a, Mariana S. Arruda^a, Deborah M.L. Zanforlin^a, Marek H.F. Ekert^a,
Danyelly Bruneska^{a,b}, José L. Lima-Filho^{a,b}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil

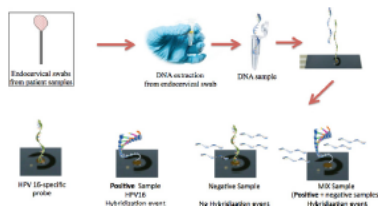
^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Av. Professor Moraes Rego s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, 57309-005, Bom Sucesso, Arapiraca, AL, Brazil

HIGHLIGHTS

- Electrochemical biosensor was used to detecting human papillomavirus (HPV) in real samples from endocervical swabs.
- The detection limit was of 18.13 nM.
- No hybridization with non-complementary sequence showed that the method is selective.
- It can be an excellent approach to detect human papillomavirus (HPV) in real samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2013

Received in revised form 8 October 2013

Accepted 16 October 2013

Available online 25 October 2013

Keywords:

Electrochemical DNA biosensor

Human papillomavirus 16

Methylene blue

Screen-printed electrode

ABSTRACT

An electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus (HPV) 16 detection has been developed. For this proposed biosensor, L-cysteine was first electrodeposited on the gold electrode surface to form L-cysteine film (CYSFILM). Subsequently, HPV16-specific probe was immobilized on the electrode surface with CYSFILM. Electrochemistry measurement was studied by differential pulse voltammetry method (DPV). The measurement was based on the reduction signals of methylene blue (MB) before and after hybridization either between probe and synthetic target or extracted DNA from clinical samples. The effect of probe concentration was analyzed and the best results were seen at 1000 nM. The hybridization detection presented high sensitivity and broad linear response to the synthetic-target concentration comprised between 18.75 nM and 250 nM as well as to a detection limit of 18.13 nM. The performance of this biosensor was also investigated by checking probe-modified electrode hybridization with extracted DNA from samples. The results showed that the biosensor was successfully developed and exhibited high sensitivity and satisfactory selectivity to HPV16. These results allow for the possibility of developing a new portable detection system for HPV16 and for providing help in making an effective diagnosis in the early stages of infection.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Epidemiological studies showed that infection with high-risk types (HR) of human papillomavirus (HPV), with large predominance of the genotype 16, is associated with nearly 100% of cases of cervical cancer and with a significant number of vaginal, vulvar, penile, and anal cancers [1,2].

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8484; fax: +55 81 2126 8000.
E-mail addresses: daniellysantos@hotmail.com, daniellysantos@gmail.com (D.S. Campos-Ferreira).

**APÊNDICE C – DNA GENOTYPING ANALYSIS OVERVIEW: PROFILE OF
RAPE CASES IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL**



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

DNA genotyping analysis overview: Profile of rape cases in the state of Pernambuco, Brazil



N.C.L. Oliveira^{a,*}, M.H.F. Ekert^a, C.A. Souza^b, K.C.N. Rabêlo^b, S.M. Santos^c,
J.L. Lima-Filho^{a,d}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF), Gerência Geral de Polícia Científica – GGPOC, Estrada da Batalha s/n, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brazil

^c Gerência Geral de Polícia Científica (GGPOC), Secretaria de Defesa Social do Estado de Pernambuco, Rua São Geraldo, nº 111, 1º andar, Santo Amaro, CEP 50040-020, Recife, PE, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2015

Accepted 23 September 2015

Available online 26 September 2015

Keywords:

Rape cases
Human identification
DNA markers

ABSTRACT

Identification of perpetrators is crucial in criminal investigations, mainly in rape cases. Analysis of the area, victims' profile, as well as genotyping DNA markers from rapists may help to determine hotspots of the crime, in a way to prevent its recurrence. Herein, we report for the first time in Northeastern Brazil a preliminary genetic data analyses from rape cases that occurred in Pernambuco between 2012 and 2014. Moreover, the distribution of the cases, as well as a general profile of the victims were analyzed from official reports of Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF-PE). The results showed that 62% of the cases are mainly located in the metropolitan area of Pernambuco. Eighty-eight percent of the victims were females and 37% were under age. Allele frequency was determined by at least 15 STRs and, in some cases, by Y-STRs and InDel markers. This study may contribute to the elucidation of rape crime investigation in the future.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Rape is a crime committed by several types of perpetrators who attack different kind of victims under many different circumstances [1]. Obtaining the profile of the victims and the DNA markers of both victims and offenders constitute an important input to identify hotspots of the crime and design strategies in a way to prevent its recurrence [2–4]. Due to the lack of this type of studies in Northeastern Brazil population, a preliminary analysis of rape cases that occurred in Pernambuco between 2012 and 2014 is presented herein, where DNA genotyping is used for human identification.

2. Materials and methods

In this study, reports of rape cases that occurred in Pernambuco between 2012 and 2014 were obtained from Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense. In a way to obtain a general profile of the victims, variables as gender, age, relationship between offender and victim as well as geographical localization were analyzed.

In addition, the frequency of the following DNA markers used in each case was also evaluated: D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338 and Amelogenin, for autosomic STR, DYS19, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a, DYS385b, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, YGATA H4, for Y-STR and one Y Indel.

* Corresponding author. Fax: +55 81 2126 8000.

E-mail address: nataliacybelle89@gmail.com (N.C.L. Oliveira).