



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Aline Faria Galvani

Análise da frequência de polimorfismos nos genes *IL28B* e *IL28R1* em pacientes acometidos por Meningioma

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu
2015

Aline Faria Galvani

Análise da frequência de polimorfismos nos genes *IL28B* e *IL28R1* em pacientes acometidos por Meningioma

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Galvani, Aline Faria.

Análise da frequência de polimorfismos nos genes *IL28B* e *IL28R1* em pacientes acometidos por meningiomas / Aline Faria Galvani. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini
Coorientador: Adriana Camargo Ferrasi
Capes: 40101002

1. Polimorfismo (Genética). 2. Genes. 3. Sistema nervoso central - Tumores. 4. Meningioma.

Palavras-chave: *IL28B*; *IL28R1*; Polimorfismo.

Aline Faria Galvani

**Análise da Frequência de Polimorfismos nos genes *IL28B* e *IL28R1* em
pacientes acometidos por Meningioma**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Médica
FMB/ UNESP - Botucatu - SP.

Prof. Ass. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorst
Membro
Depto. de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará UFC – Ceará - CE

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro
Membro
Depto. de Biologia Molecular e Imunofarmacologia
Universidade de São Francisco – Bragança
Paulista - SP.

Botucatu, 20 de agosto de 2015.

Dedicatoria

Dedico esta conquista a todos aqueles que fizeram de algum modo, a diferença em minha vida. De forma especial, aos meus pais, Carlos e Valéria, por tudo que tens feito por mim, sem medir esforços para que os meus sonhos fossem realizados, anteriormente aos seus.

Agradecimientos

Agradeço a Deus por me conceder a vida, estando a minha frente, para me guiar; ao meu lado, para me acompanhar; atrás de mim para me proteger e acima de mim para me abençoar. Sem Ele, nada seria possível.

Às minhas orientadoras e conselheiras a quem admiro e me espelho, Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini (orientadora), Dra. Adriana Camargo Ferrasi (co-orientadora) e Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, pelos conhecimentos cedidos, pela orientação, confiança, atenção e sem dúvidas, por terem me ajudado e tornado possível trilhar e concluir esta etapa em minha vida profissional.

Aos colaboradores deste trabalho, Dr. Marco Antônio Zanini, Dr. Mário Henrique Girão Faria, Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst e suas respectivas equipes, por terem apostado e colaborado ativamente para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais Carlos e Valéria e também ao meu irmão Guilherme, pelo amparo, paciência, amizade e amor incondicional.

Aos meus avós João (em memória), Irene Maria, Carlos, Aparecida, pelas orações e por sempre estarem ao meu lado, com muita paciência e muito amor. Estes meus queridos avós são os meus exemplos de pessoas dignas, batalhadoras, honestas e vencedoras nas árduas trajetórias da vida.

Aos meus padrinhos, Luís e Salete, pelos conselhos, carinho e momentos inesquecíveis de muita diversão e a minha prima Lívia Faria, por sua companhia, paciência, serenidade e os cafés nos “Dias das Fofocas”.

À minha amiga/irmã Lívia Santos por todos os momentos de carinho e atenção com meus risos e choros, pela paciência durante a minha impaciência, pela mão estendida em minhas dificuldades e principalmente, por ser quem é e do jeito que é em minha vida.

Ao Diego Moraes e sua família, pelo seu companheirismo, paciência, alto-astral, amor e muito carinho durante esta fase da minha vida.

Aos pacientes que mostraram sua generosidade, aceitando participar deste estudo.

A equipe/amigos do Laboratório de Biologia Molecular (Rotina e Pesquisa), pela valiosa ajuda, conselhos, amizade, conversas, caronas e muitas comilanças. Aline Aki, Nathália Picelli, Sarita, Renata Zugaib, Regina, Maércio, Aline Del’Vescovo, Viviam, Kelly Colussi, Micheli, Nathália Almeida, Fran e Carol, vocês fizeram meus dias muito mais felizes e divertidos.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, Ana Maria Mengue, e também a toda equipe da Sessão Técnica de Pós-graduação, pela disponibilidade em ajudar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, e não menos importante, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste projeto, deixo explícito aqui o meu muito obrigada!!

Epigrafe

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu
mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer
entendimento.”

Clarice Lispector

Resumo

RESUMO

GALVANI, A.F. **Análise da Frequência de Polimorfismos nos genes *IL28B* e *IL28R1* em pacientes acometidos por Meningioma.** Botucatu, 2015. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Os meningiomas são os tumores mais frequentes do Sistema Nervoso Central e sua classificação é dada quanto ao tipo celular envolvido e grau de malignidade. Os interferons (IFNs) foram inicialmente associados à resposta antiviral, contudo, estudos posteriores evidenciaram o envolvimento dessas citocinas na regulação do crescimento celular e no efeito imunomodulatório. A Interleucina 28B (*IL28B*), membro da família dos IFNs do tipo III, parece estar envolvida na resposta imune antiviral e antitumoral. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência de variações genéticas em *IL28B* e *IL28R1* em pacientes acometidos por Meningiomas. Sessenta paciente tratados pelo serviço de Neurocirurgia da UNESP de Botucatu/SP foram incluídos neste estudo. A análise do polimorfismo *rs12979860 C/T* teve significância estatística quando comparou-se a frequência genotípica da população brasileira em relação a presente casuística. Foi descrito a detecção de novas variações genéticas (missense e silent) nos genes *IL28B* e *IL28R1* ao comparar com as respectivas sequencias referencias disponíveis em banco de dados (NCBI). Estes dados sugerem uma importante relação destas variações genéticas em relação a estrutura e função das proteínas envolvidas, entretanto um estudo mais aprofundado das consequências dessas alterações na gênese e/ou progressão dos meningiomas devem ser considerado.

Palavras-chave: *IL28B*; *IL28R1*; Mutação; Polimorfismo.

Abstract

ABSTRACT

GALVANI, A.F. **Analysis of the frequency of the polymorphisms in *IL28B* and *IL28R1* genes in patients affected by meningiomas.** Botucatu, 2015. 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Meningiomas are the most common tumors of the central nervous system, despite being benign and grow slowly, can recur in case of incomplete surgical resection. They are classified according to the cells involved and their rate of malignancy. The role of the immune system in preventing the emergence and progression of tumors has been the subject of many studies in the field of tumor immunology. Interferon (IFNs) were originally associated with antiviral response, however, subsequent studies revealed the involvement of these cytokines in the regulation of cell growth and their immunomodulatory effect. Thus, the aim of this study was to analyze the genetic variation frequency of *IL28B* and *IL28R1* in patients with meningioma. Sixty patients treated by UNESP Neurosurgery service of Botucatu/SP were included in this study. Polymorphism rs12979860 C/T analysis showed statistical significance when compared with healthy Brazilian's genotypic frequency. New genetic variation (missense and silent) were detected in *IL28B* and *IL28R1* through reference sequences analysis (NCBI). These data support an important relation of these genetic variations related to protein functions, however other studies of the consequences of these changes in the development and progression of meningiomas should be considered.

Keyword: *IL28B*; *IL28R1*; Mutation; Polymorphism.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVO.....	24
a) Objetivos Gerais	24
b) Objetivos Específicos	24
3. CASUÍSTICA.....	26
a) Premissas Éticas	26
b) Cálculo do número amostral	26
c) Casuística	26
d) Critérios de inclusão	26
e) Critérios de exclusão.....	27
4. METODOLOGIA	27
4.1 Coletas, processamento inicial e armazenamento dos materiais biológicos.....	27
4.2 Análise germinativa do gene <i>IL28B</i>	28
4.3 Análise germinativa das variações genéticas no receptor do gene <i>IL28B (IL28R1)</i>	32
4.4 Sequenciamento do gene <i>IL28B</i> e das regiões codificantes de <i>IL28R1</i>	33
5. Resultados.....	36
a) Análise do gene <i>IL28B</i>	41
b) Análise do gene <i>IL28R1</i>	49
6. DISCUSSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS.....	66

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), embora sejam considerados raros, têm sido diagnosticados com maior frequência nos últimos anos, sobretudo entre pacientes acima de 65 anos (TAKKAR, MCCARTHY, VILLANO, 2014). Autores sugerem que este aumento deve-se às melhorias nas técnicas diagnósticas, cada vez mais sensíveis e menos invasivas, como a ressonância magnética (IRM) e a tomografia computadorizada (TC) (INCA, 2012; GLOBOCAN, 2012; ABTA 2014).

Em 2015 foi estimada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a ocorrência de, aproximadamente, 154.000 novos casos de tumores do SNC entre pessoas com idade inferior a 60 anos de ambos os sexos e, em torno de 103.000 novos casos nos mais idosos (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2014, 4.960 novos casos em homens e 4.130 novos casos em mulheres (INCA, 2014).

As neoplasias do SNC são classificadas de acordo com o tipo histológico do tumor primário. Dentre os mais comuns, destacam-se os Gliomas, seguidos dos Meningiomas e, posteriormente, dos Ependimomas (SANTOS, et al., 2001).

Os Gliomas são tumores primários do SNC que se originam a partir das células da glia (Astrócitos, Oligodendrócitos, Micróglia ou Ependimócitos), que atuam na sustentação, proteção ou nutrição dos neurônios, adquirindo nomenclatura específica de acordo com o tipo celular envolvido (ABTA 2014). Esse tipo tumoral penetra difusamente pelo cérebro e, podem ser divididos em 4 graus de malignidade (I, II, III e IV) (SUAREZ, et al., 2012; ABTA, 2012), compreendendo de 30% a 40% da totalidade dos tumores intracranianos. Acometem com maior frequência indivíduos adultos, de ambos os sexos (SCHNEIDER, et al., 2010).

Os Meningiomas possuem origem de células meningoteliais da membrana aracnóide. De forma geral, apresentam-se como lesões únicas, arredondadas e bem definidas. Embora sejam considerados tumores benignos, a localização desses tumores é fator determinante para a gravidade da doença, visto que podem localizar-se em locais de difícil acesso cirúrgico e próximos à áreas nobres do sistema nervoso central (BUETOW, et al., 1991; ABTA, 2014).

Estes tumores correspondem de 20 à 25% de todas as neoplasias do SNC (SANTOS, et al., 2001; CANCER RESEARCH UK, 2014), acometendo mais

frequentemente mulheres de meia idade (HSU; EFIRD; HEDLEY-WHYTE, 1997; WAHAB; AL-AZZAWI; 2003; DANGELO; FATINI, 2008, PARK et al., 2009).

Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (2000), os Meningiomas podem ser subdivididos em 3 graus de malignidade, sendo Grau I - Meningiomas benignos (Meningotelial, Fibromatoso e Transicional), Grau II - Meningioma atípico e Grau III- Meningioma maligno/anaplásico. Os graus II e III, segundo a OMS, têm sido relacionados à maior chance de recidiva tumoral (LOUIS, et al., 2007).

Os graus de malignidade tumoral são caracterizados conforme aspectos comportamentais e histológico do tumor, observando-se o potencial proliferativo, presença de necrose e invasão cortical (LOUIS, et al., 2007), sendo que o prognóstico tumoral encontra-se intimamente relacionado aos graus de malignidade dos mesmo (BWH, 2012).

Os tumores primários do SNC, ou seja, aqueles que não provêm de metástases, são considerados de origem multifatorial, onde a exposição ambiental e a predisposição genética estão intimamente relacionadas à tumorigênese (GU, et al., 2009). Alergias, infecções, traumas de cabeça, uso de drogas e medicações, dietas, exposição ao tabaco, uso de álcool, exposição a radiações ionizantes, entre outros, são citados como fatores ambientais importantes que podem estar relacionados ao surgimento dos tumores primários (WRENSCH, et al., 2002; CLAUS, et al., 2005).

O papel do sistema imunológico na prevenção ao surgimento e progressão de tumores tem sido alvo de uma grande quantidade de estudos no campo da imunologia tumoral. Estudos em humanos e animais de experimentação imunocomprometidos têm evidenciado maior incidência de tumores, comprovando a importância da resposta imune natural e adaptativa na progressão tumoral. Contudo, os resultados são ainda controversos e carecem de maiores esclarecimentos (de VISSER et al., 2006).

Inicialmente, esperava-se que todas as células tumorais expressassem proteínas estranhas ao organismo, porém, essa é a realidade de poucos tumores, frequentemente aqueles induzidos por vírus oncogênicos, nos quais as proteínas virais são antígenos estranhos e tumores induzidos em animais por carcinógenos potentes (como o metilcolantreno) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011).

Embora muitos tumores espontâneos provoquem imunidade fraca ou mesmo indetectável, o conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares de várias células pré-tumorais tornou evidente que a vigilância imunológica e a

imunidade tumoral variam conforme o tipo de tumor, condições orgânicas, ambientais e o perfil genético do organismo, o que pode torná-las ineficazes ou até mesmo favoráveis ao tumor (PIEMONT; ZERBI; DI CARLO, 2003).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, sintetizadas durante a fase de ativação e efetora da imunidade inata e específica. A resposta imune é mediada pela liberação de diferentes citocinas, que influenciam a produção e atividade umas das outras, formando um sistema de inter-relação dessas proteínas imunorregulatórias (DRANOFF, 2004).

Os interferons (IFNs) são glicoproteínas pertencente à família das citocinas, classificados em três grupos distintos: Tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ e IFN- ω); Tipo II (IFN- γ) e Tipo III (IFN- λ : IL-28A, IL-28B, IL-29) interagindo *via* receptores celulares específicos, controlando a homeostasia do organismo (VÁZQUEZ; GÓMES; DAFNY, 2012). Tais proteínas são produzidas em situações fisiológicas por diversos tipos celulares como macrófagos, monócitos, linfócitos T, células da glia e neurônios, atuando na adesão celular, metabolismo, controle de crescimento e diferenciação celular, com efeito antiproliferativo (DAFNI; YANG, 2005; LIN et al., 2012).

Inicialmente, os IFNs foram associados à resposta antiviral, contudo, estudos posteriores evidenciaram o seu envolvimento na regulação do crescimento celular e no efeito imunomodulatório (STARK et al., 1998; GOODBOURN et al., 2000).

Quanto à atividade antiproliferativa, foram as primeiras proteínas naturais observadas com ação reguladora negativa sobre células em crescimento, com ação antagônica à maioria dos fatores de crescimento.

Um membro da família de IFNs do tipo III, subfamília de IFN- λ 3 (lambda), a Interleucina 28B (*IL28B*), parece ter um papel fundamental nas respostas imunes antivirais e antitumorais (KOTENKO et al., 2003). Essa proteína é codificada pelo gene *IFNL3* (*interferon, lambda 3*), localizado no *locus* 19q13 e possui seis *exons* (SHEPPARD et al., 2003; LI et al., 2009; WITTE et al., 2010).

Semelhante aos IFNs do tipo I (IFN- α , IFN- β), o IFN do tipo III age no microambiente de forma global. Esta proteína estimula as atividades citóticas das células *natural killer* (NK), o aumento da expressão de antígenos celulares *via* MHC de classe I, pelas células do microambiente bem como nas apresentadoras de antígenos (APCs), facilitando o aumento do reconhecimento dos antígenos pelos

linfócitos T citotóxicos (TCD8+) auxiliados pelos linfócitos T auxiliares (TCD4+) e pelo aumento da produção de anticorpos pelas células B, favorecendo a degradação celular (PIEMONT; ZERBI; DI CARLO, 2003; WITTE et al., 2010).

Nas últimas décadas, o IFN- α têm sido utilizado como adjuvante ao tratamento das hepatites B e C (MONDELLI et al., 2012) e, mais recentemente, em algumas tentativas na terapia contra melanomas, tumores de rim e algumas leucemias (KIRKWOOD et al., 2001; TARHINI; GOGAS; KIRKWOOD, 2012; AMIN; WHITE, 2013). Entretanto, os efeitos colaterais do tratamento são tóxicos e severos, o que torna difícil a sua continuidade (FUNG; LOK, 2004; PESTKA, 2007; HEIM, 2012).

Quando as sequências nucleotídicas e/ou peptídicas de IFNs I e IFNs III são comparadas, nota-se pouca similaridade, algo em torno de 12% de identidade (FOX et al., 2009). Contudo, ambas citocinas exercem ação antiviral pelo desencadeamento da mesma cascata de sinalização intracelular, via JAK1 e TYK2 (DUMOUNTIER et al., 2004; TAGAWA et al., 2011) e a alta similaridade funcional entre os IFNs tipo I e tipo III sugere que ambos possuam funções sobrepostas e redundantes na resposta antiviral e, possivelmente, antitumoral.

Baseados nesse conhecimento, vários estudos estão sendo dirigidos para investigar o potencial antitumoral dos IFN- λ (STEEN; G MERO, 2010), principalmente devido à menor toxicidade desta citocina (MILLER et al., 2009).

Resultados encorajadores tem sido apresentados para certos tipos de cânceres como tumores neuroendócrinos (ZITZMANN et al., 2006), carcinomas de esôfago (LI et al., 2009), tumores intestinais (BRAND et al., 2005), hepatocarcinomas (ANK et al., 2006; DOYLE et al., 2006; MARCELLO et al., 2006), adenocarcinomas de pulmão (MEAGER et al., 2005), linfoma de Burkitt (ZHOU et al., 2009) e melanoma (GUENTERBERG et al., 2010). Autores demonstraram a ação de IFN- λ na inibição da proliferação celular na linhagem de células tumorais LN319 de glioblastoma (MEAGER et al., 2005).

Postula-se que, uma vez que o receptor para IFN- α (complexo IFN R1 e IFNAR2) é expresso pela maior parte das células e o receptor para IFN- λ (complexo IFN- λ R1 e IL10R2) tem padrões de expressão restritos somente a alguns tipos celulares (WITTE et al., 2010), os efeitos tóxicos do último sejam menos severos, principalmente no que diz respeito à supressão da medula óssea, pela expressão limitada do receptor de IFN- λ em células hematopoiéticas (LI et al., 2009).

O trato gastrointestinal, respiratório, coração, diversas glândulas, baço, timo e células mononucleares do sangue periférico foram descritos expressando altos níveis de receptores R1 (WITTE et al., 2009), entretanto, níveis mais baixos deste receptor foram observados no cérebro, variando conforme as células neuronais e neuroendócrinas (ZHOU et al., 2009).

Observa-se que o efeito antiproliferativo dos IFN- λ s é dependente do nível de expressão de seu receptor (LASFAR et al., 2011). O complexo receptor para IFN- λ é composto por duas subunidades transmembranares, IL28R1 e IL10R2, que interagem com três citocinas relacionadas, IL28A (IFN- λ 2), IL28B (IFN- λ 3), e IL29 (IFN- λ 1) (SHEPPARD et al., 2003; LI et al., 2009).

A ligação entre IL28B e IL28R1 promove modificações conformacionais no heterodímero, permitindo a união da segunda cadeia do receptor (IL10R2). O complexo formado pelos três elementos (IL28B, IL28R1 e IL10R2) produz um sinal de ativação para duas tirosina-quinases intracelulares, denominadas JAK1 (Janus Kinase) e TYK2 (Tirosina Kinase), o que permite a fosforilação das proteínas STATs (Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição) (WITTE et al., 2010), que ao chegarem ao núcleo iniciam a transcrição de genes ativadores de interferons (INFs) (ZITZMANN et al., 2006).

Ainda, a ação combinatória entre IFN- α e IFN- λ (*lambda*) parece agir na modulação da angiogênese tumoral, tornando essa associação uma potencial terapia antitumoral (FABRIS et al., 2011). Outro estudo demonstrou que a presença de IFN- λ reduz a vascularização tumoral *in vivo* (FABRIS et al., 2006).

Recentemente foi descoberto que o SNP *rs12979860* C/T localizado 3 mil bases antes do gene *IL28B* (região não codificante) prediz o resultado do tratamento com IFN- α peguillado associado com ribavirina (RBV) contra o vírus da hepatite C. Indivíduos com o genótipo CC apresentaram maiores chances de depuração viral quando comparados àqueles com genótipo TT (25%) e CT (razão intermediária) (FABRIS et al., 2011; BIBERT et al., 2013). Este polimorfismo parece estar associado ao aumento da expressão no RNA mensageiro (RNAm) do *IL28B* (XIE et al., 2012; BELLANTI et al., 2012), contudo, a literatura científica carece de estudos sobre a importância desse polimorfismo na carcinogênese ou progressão tumoral.

As informações acima consideradas levam à hipótese de que alterações genéticas em *IL28B* e *IL28R1* poderiam estar envolvidas com o início e/ou a progressão tumoral.

As características das respostas imunes a vírus e a tumores são muito semelhantes, quando comparados os tipos celulares envolvidos e quanto a produção de agentes pró-inflamatórios e pró apoptóticos. Sabe-se que o polimorfismo no gene da *IL28B* (*rs12979860*) foi intimamente associado à melhor resposta ao tratamento do vírus da hepatite C em pacientes infectados pelo vírus C, então, sugere-se que a presença deste polimorfismo possa ser relevante para a resposta imune antitumoral, bem como nos meningiomas.

Nesse contexto, de maneira inédita, o objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de variações genéticas em *IL28B* e *IL28R1* e associar estes achados com as características clínicas e epidemiológicas desses pacientes.

Objetivo

2. OBJETIVO

a) Objetivos Gerais

Analisar a frequência de variações genéticas em *IL28B* e *IL28R1* em pacientes acometidos por Meningioma.

b) Objetivos Específicos

- Analisar a frequência do polimorfismo *rs12979860* C/T de pacientes acometidos por Meningioma;
- Sequenciar o gene *IL28B* (*IFNL3* - *interferon lambda 3*) por completo, buscando por variações genéticas ainda não identificadas;
- Sequenciar a região codificante do gene *IL28R1*, buscando por novas variações genéticas;
- Comparar as regiões genômicas obtidas com sequências-referência depositadas no *GenBank*;
- Comparar os resultados encontrados com dados anatomopatológicos e epidemiológicos desses paciente e com as informações genômicas disponíveis em bancos de dados públicos.

*Casística e
Metodologia*

3. CASUÍSTICA

a) Premissas Éticas

O referido projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP sob número de aprovação no CEP 477.105/2013 (Anexo 1).

b) Cálculo do número amostral

O cálculo do número amostral a serem incluídos no presente estudo, foi realizado por um profissional estatístico, onde o intervalo de confiança foi de 95% e a margem de erro utilizada foi de 10%, obtendo-se assim o número amostral ideal para as análises de 60 pacientes.

c) Casuística

Pacientes portadores de Meningioma operados de acordo com a rotina de atendimento do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e do Hospital Mário Gatti, Campinas-SP foram convidados a participar deste estudo, totalizando 60 casos.

Os pacientes convidados a participar foram informados sobre a pesquisa verbalmente e por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2). Após o exposto entendimento desta pesquisa, estes pacientes, ou seu responsável legal, manifestaram a concordância em participar, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

d) Critérios de inclusão

I- Presença ou suspeição de Meningiomas com indicação neurocirúrgica formal, incluindo casos de recidivas; II- Possibilidade de coleta de 4mL de sangue total do paciente durante o procedimento cirúrgico, sem prejuízo ao paciente ou a outros exames necessários; III- Possibilidade de coleta de fragmentos tumorais (3mm³) durante o procedimento cirúrgico, sem que haja qualquer prejuízo ao exame histopatológico ou a outros que porventura sejam necessários; IV- Expresso entendimento e concordância em participar do estudo, manifestada pelo paciente ou pelo seu responsável legal, previamente à cirurgia, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

e) Critérios de exclusão

I- Pacientes que reconhecidamente apresentarem neoplasias de origem diversa às previamente estabelecidas; II- Pacientes com tumores primários do SNC recidivantes previamente tratados com radioterapia e/ou quimioterapia de qualquer modalidade; III- Pacientes com tumores pequenos, dos quais se obtenha material escasso ou insuficiente para o estudo histopatológico e/ou outros exames necessários; IV- Pacientes ou responsáveis legais que não tenham conseguido compreender suficientemente as diretrizes da pesquisa ou que tenham se negado a participar do estudo, conforme estabelecido no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4. METODOLOGIA

4.1 Coletas, processamento inicial e armazenamento dos materiais biológicos

a) Coleta de Sangue Total

A alíquota contendo aproximadamente 4mL de sangue total foi coletada durante o procedimento cirúrgico, em tubo contendo anticoagulante (EDTA). Uma alíquota de sangue total foi separada e o restante centrifugado por 15 minutos a 600xg para separação de Plasma e Células Brancas (*BuffyCoat*).

b) Armazenamento das Amostras

As 60 amostras foram coletadas, processadas, identificadas através de códigos e, posteriormente armazenadas em freezer à -80°C, no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu (UNESP) - Divisão Hemocentro, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini.

c) Extração de Ácidos Nucleicos (DNA) de Sangue Total

A extração de DNA de sangue total dos 60 casos, foi realizada utilizando-se o kit AxyPrep Blood Genomic DNA mini prep Kit (Axygen AxyPrepTM - Biosciences) segundo as especificações do fabricante.

Determinou-se, então, a concentração do ácido nucléico, em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000), sendo cada amostra avaliada quanto a sua

pureza, pela razão de absorbância A260/A280nm (~1,8), e concentração estimada na unidade nanogramas por microlitros (ng/μL).

4.2 Análise germinativa do gene *IL28B*

a) Análise do polimorfismo rs12979860 C/T (região 5'UTR)

Para a análise do polimorfismo, utilizou-se o DNA extraído de sangue total dos pacientes e, após procedeu-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do fragmento desejado.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), para amplificação da região do polimorfismo rs12979860 C/T, foram descritas por Fabris et al., (2011), tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos *primers forward* e *reverse* para amplificação da região do polimorfismo rs12979860 do gene da *IL28B*.

<i>Primers</i>	Sequência 5' - 3'	Produto de Amplificação (pares de bases – pb)
<i>Forward</i>	GCTTATCGCATACGGCTAGG	242pb
<i>Reverse</i>	AGGCTCAGGGTCAATCACAG	

*Fabris et al., 2011.

O protocolo padronizado, obtido a partir do descrito por Fabris et al., (2011) para esta reação encontra-se descrito abaixo:

A reação de PCR foi composta por: tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20mM (pH 8,4), KCl 50mM), 1,25U de *Platinum Taq DNA Polimerase* Invitrogen, 0,48mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,8mM de MgCl₂, 0,24μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100ng de DNA, totalizando 25μL de mistura para PCR.

Esta mistura foi, então, submetida a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos (desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 62°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Essa reação foi revelada em gel de poliacrilamida 6% (SAMBROOK et al., 2001) corado por nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994).

O produto total amplificado na reação foi incubado a 60°C por 6 horas, sob a ação da enzima de restrição *BstUI* (New England Biolabs, Hitchin, UK).

O resultado foi interpretado de acordo com o padrão de bandas obtido no gel, a presença de três bandas de 135, 82 e 25pb caracterizam o genótipo CC; quatro bandas de 160, 135, 82 e 25pb o genótipo heterozigoto CT; duas bandas de 160 e 82pb evidenciam o genótipo TT, como ilustrados na figura 1.

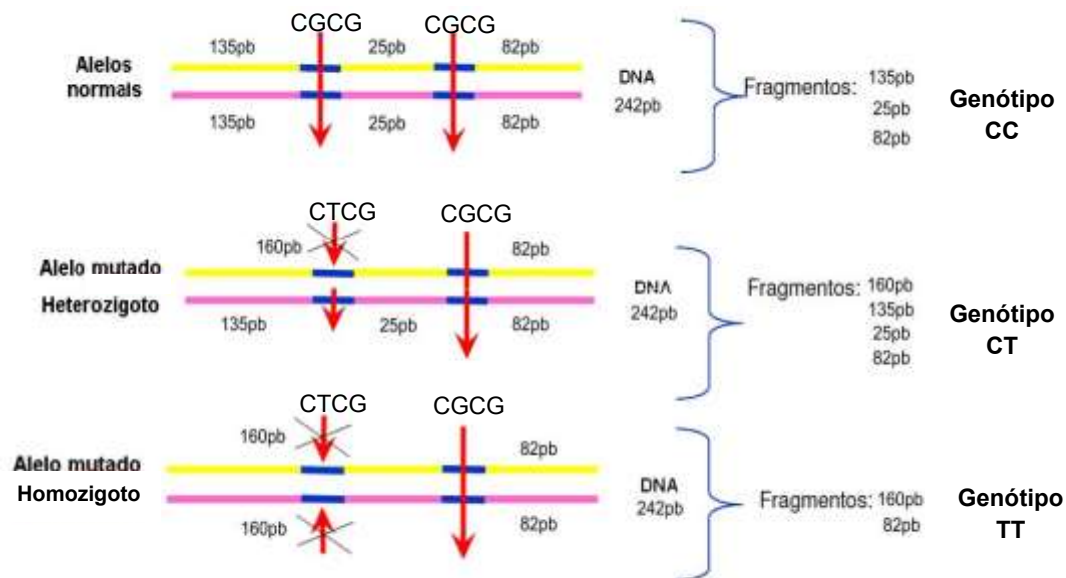


Figura 1. Esquema ilustrativo dos perfis genotípicos para o polimorfismo *rs12979860* do gene da *IL28B*, evidenciando os genótipos CC, CT e TT.

A análise da digestão dos produtos da PCR foi feita pela visualização dos fragmentos em géis de poliacrilamida não desnaturante 7% (SAMBROOK *et al.*, 2001) corados por nitrato de prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994).

b) Análise das variações genéticas no gene *IL28B*

- Desenho dos Oligonucleotídeos Iniciadores

Para amplificação total do gene da *IL28B*, foram desenhados quatro pares de *primers* (A, B, C e D), cujas regiões de anelamento e amplificação dos *primers*, em pares de bases (pb) supracitados encontram-se ilustradas na figura 2.

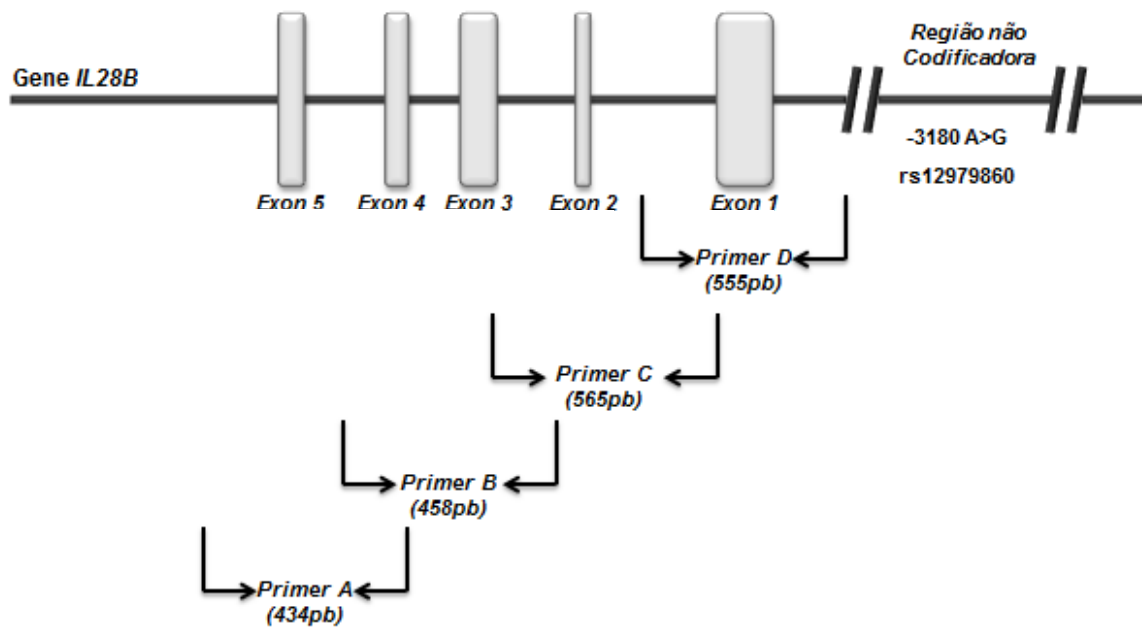


Figura 2. Representação esquemática das regiões de anelamento dos *primers* e seus produtos de amplificação em pares de bases (pb). Para amplificação completa do gene da *IL28B* foram desenhados quatro pares de *primers*, cujos produtos juntos e sobrepostos em suas extremidades, representam o gene inteiro. As caixas preenchidas representam os *exons* e as linhas contínuas os *introns*.

*NCBI (National Center for Biotechnology Information) e UCSC Genome Bioinformatics.

O desenho dos *primers* foi realizado com o auxílio de ferramentas de bioinformática, através do software *Primer-BLAST*, disponível *online*, no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As sequências *forward* e *reverse* de cada primer encontram-se descritas na tabela 2.

Tabela 2. Sequências dos primers *forward* e *reverse* e extensão dos produtos de amplificação dos fragmentos do gene da *IL28B*.

<i>Primers</i>	Forward Sequência 5' - 3'	Reverse Sequência 5' - 3'	Produto de Amplificação (pares de bases – pb)
A	TCTCAGGTTGCATGACTGGC	GCACCATATCCTCTCCCAGC	434pb
B	CTCAGAGCTCACAGACCTGG	CAGCTGCAGGTGAGAGGG	461pb
C	CACTACAGAGCCAGGTGAGC	GACCGTGACTGGAGCAGTTC	565pb
D	AAGGCATCTTTGGCCCTCTT	CGGTGTCTTACCTGAGGCTG	555pb

*NCBI –National Center for Biotechnology Information.

- PCRs dos Fragmentos A, B, C e D

As reações de PCRs foram específicas para cada par de *primers* A, B, C e D. Seus respectivos produtos de amplificação foram chamados de fragmentos A, B, C e D.

Os protocolos utilizados para amplificar os fragmentos A, B, C e D encontram-se descritos na tabela 3.

Tabela 3. Protocolos das PCRs para os fragmentos A, B, C e D do gene da *IL28B*.

Reagentes	Concentrações			
	Frag. A	Frag. B	Frag. C	Frag. D
H ₂ O	q.s.p.* 25,0µL	q.s.p.* 25,0µL	q.s.p.* 25,0µL	q.s.p.* 25,0µL
Buffer 10x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTP (10mM)	0,4 mM	0,4 mM	0,4 mM	0,4 mM
Primer Forward(10µM)	0,4µM	0,4µM	0,4µM	0,4µM
Primer Reverse (10µM)	0,4µM	0,4µM	0,4µM	0,4µM
Taq Platinum (Invitrogen) (5U/µL)	1U	1U	1U	1U
DNA genômico	150ng	150ng	150ng	150ng
Volume total	25,0 µL	25,0 µL	25,0 µL	25,0 µL

*q.s.p.: Quantidade suficiente para.

Condições de termociclagem:

- A B e C: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 45 segundos; anelamento à 61°C por 1 minuto; extensão à 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos.
- D: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 45 segundos; anelamento à 56°C por 1 minuto; extensão à 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 7 minutos.

As amostras foram reveladas em gel de poliacrilamida 6% (SAMBROOK et al., 2001) corados por nitrato de prata (SANGUINETTI et al., 1994).

4.3 Análise germinativa das variações genéticas no receptor do gene *IL28B* (*IL28R1*)

a) Desenho dos Oligonucleotídeos Iniciadores

O desenho dos *primers* para amplificação da região codificadora do gene *IL28R1* foi realizado com o auxílio da mesma ferramenta de bioinformática utilizada para os *primers* do gene da *IL28B*.

A figura 3 ilustra a disposição dos *exons* que codificam a proteína transmembrana do receptor da *IL28B*, sendo os *primers* construídos para amplificarem somente a região codificadora deste gene (Tabela 4), visto tratar-se de um gene longo (33.119pb) com extensas regiões intrônicas.

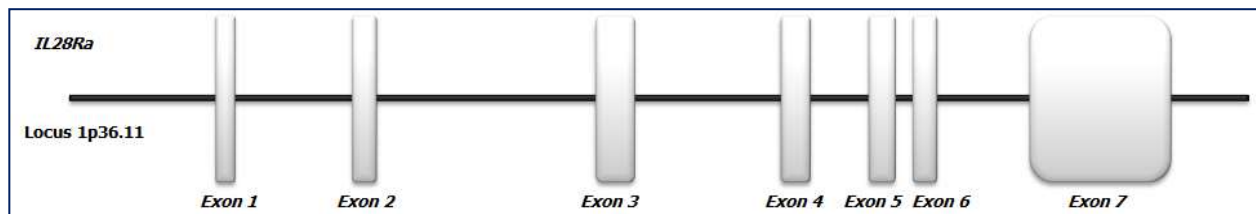


Figura 3. Representação ilustrativa do gene codificador da proteína IL28R1*. As caixas preenchidas representam os *exons* e as linhas contínuas os *introns*.

*NCBI (National Center for Biotechnology Information) – Sequência referência NC_000001.11.

Tabela 4. Sequências dos primers *Forward* e *Reverse* para amplificação da região codificante do gene *IL28R1*.

<i>Primers</i>	Forward Sequência 5' - 3'	Reverse Sequência 5' - 3'	Produto de Amplificação (pares de bases – pb)
Exon 1	CTCCGGGTCCGAGGGTA	GGGAGGCGGGGACCT	182pb
Exon 2	CACATGCCATCTCCCGTAGG	CTGAGTCAAGACCAGCCAGG	315pb
Exon 3	AGAACCACTGAGCACTGAGC	CCCAAGCTCTCCTCTCTCCT	288pb
Exon 4	CTGCCAGAAGTCAGGAGTGT	AGAGCTCTCTGGTCTTGGGG	355pb
Exon 5	CAAGGCCCCAGAGGGAAAGTT	GTGTGAAACCAGTCCCCACA	262pb
Exon 6	GCACACCCCCAGATTTGCTAT	GTGCAGTTGTAGACAAGAGCCAT	212pb
Exon 7	AGGTACGGAGGCTCTTGAGT	TTCTGGACACACACACCCTG	848pb

4.4 Sequenciamento do gene *IL28B* e das regiões codificantes de *IL28R1*

a) Purificação dos produtos de PCR de *IL28B* e *IL28R1*

As PCRs realizadas para cada fragmento foram purificadas utilizando-se o Kit Invisorb® Fragment Clean Up (Stratec molecular), segundo especificações do fabricante. Posteriormente, estas amostras foram reveladas em gel de agarose 1% e, então, armazenadas à -20°C até sua utilização para o sequenciamento.

b) Reação de Marcação Fluorescente de *IL28B* e *IL28R1*

Os produtos da PCR purificados foram adicionados a microplaca contendo um *primer* específico, dNTPs, tampão, a enzima *Ampli Taq DNA polimerase* e ddNTPs (dideoxynucleotídeos) marcados com fluorocromos específicos e submetidos ao protocolo técnico do fabricante. Foi realizada ciclagem específica de desnaturação, anelamento e extensão com 25 ciclos (96°C, 55°C e 60°C) em termociclador.

O protocolo de reação de marcação fluorescente utilizado, a partir de 60ng de DNA purificado, está descrito na tabela 5.

Tabela 5. Reação de marcação fluorescente para as amostras amplificadas do gene *IL28B* e da região codificante do *IL28R1*.

Reagentes	Concentrações
H ₂ O	q.s.p.* 7,0 µL
<i>Buffer (10x)</i>	1,5mM
<i>BigDye V3.1</i>	0,4µL
<i>Primer Forward ou Reverse (10µM)</i>	1,0µM
<i>DNA purificado</i>	60ng
Volume total	7,0µL

* q.s.p.: Quantidade suficiente para.

c) Desnaturação do DNA de *IL28B* e *IL28R1*

O DNA precipitado foi ressuspendido com formamida *Hi-Di – Applied Biosystems* e submetido à desnaturação a 95°C por 3 minutos. A microplaca foi mantida em gelo úmido e coberta com papel alumínio at o momento do sequenciamento.

d) Sequenciamento de *IL28B* e *IL28R1*

A determinação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos A, C e D foi realizada através do sequenciamento automático de DNA, pela técnica de reação de terminação em cadeia utilizando pelo *kit* ABI PRISM BigDye *Terminator Cycle Sequencing* versão 3.1 (Applied Biosystems), seguida por eletroforese capilar em Plataforma ABI 3500, de acordo com as recomendações do fabricante.

e) Alinhamento e análise das sequências de *IL28B* e *IL28R1*

Após o sequenciamento, a qualidade das sequências obtidas foi analisada pelo *software* SEQUENCING ANALYSIS (v5.4) do próprio equipamento de sequenciamento e pelo programa *Phred* (EWING et al., 1998; EWING et al., 1998a), adotando-se o score 20 para a validação do sequenciamento. Após as análises, aquelas sequências que ficaram de baixa qualidade, foram novamente sequenciadas.

Para montagem das sequências consenso (combinação das sequências *forward* com a *reverse*), foi utilizado o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL et al., 1999).

O mesmo programa foi utilizado para comparar as sequências consenso dos fragmentos A, B, C e D com a sequência referência do gene *IL28B* (NC_0000019.9), e também para análise das regiões codificantes do gene do *IL28R1* em relação à sua sequência referência NC_000001.11, obtidas no *GenBank* (NCBI).

Resultados

5. Resultados

5.1 Caracterização da Casuística

A casuística foi composta por 60 amostras de meningiomas, coletadas no Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e no Hospital Municipal Mário Gatti, Campinas-SP.

Dentre estas, 38 são do feminino e 22 do sexo masculino, com medianas das idades de 52 anos (entre 27 e 85 anos) e 54 anos (entre 39 e 72 anos), respectivamente.

A tabela 6 apresenta os graus de malignidade observados, distribuídos pelo gênero.

Tabela 6. Dados epidemiológicos de pacientes portadores de meningioma, distribuídos por gênero

	Gênero	Idade*	P-value**	
Feminino	63,3% (n=38)	52 (27-85)		
Masculino	36,7% (n=22)	54 (39-72)		
	Grau de Malignidade *			
	I	II	III	
Feminino	65.4%	80%	0%	p=0.0530*
Masculino	34.6%	20%	100%	

*Valores apresentados pela mediana (total range); **Valores apresentados de acordo com o número total de casos (porcentagem), comparados por Teste exato de Fisher onde $p \leq 0.05$ = relação estatisticamente significativa.

De acordo com a tabela 6, pode-se observar que a porcentagem de indivíduos do sexo feminino foi quase duas vezes maior (63,3%) ao comparar-se com o sexo masculino (36,7%).

Ao agrupar os tipos tumorais conforme seus respectivos graus de malignidade tumoral notou-se que 87% da casuística analisada é pertencente ao grau I, dentre estes, 34 pacientes são do sexo feminino (65,4%) e 18 são do sexo masculino (34,6%). Agrupando-se os graus II e III, do total de 8 casos, 50% são do sexo feminino (todas amostras de grau II) e 50% do sexo masculino (25% das amostras de grau II e 75%, grau III).

Quando analisados os três graus de malignidade em relação sua frequência, pode-se observar uma tendência a significância estatística ($p=0,0530$).

A combinação de variáveis como mediana das idades dos pacientes e os graus de malignidade tumoral também foi observada, como descrito na tabela 7.

Tabela 7. Distribuição dos graus de malignidade tumoral em relação à mediana das idades.

GRAU	MEDIANA DE IDADES	<i>P-value*</i>
I	54 anos	p= 0.0191
II	40 anos	
III	51 anos	

* Teste Anova: Considera-se $p \leq 0.05$ = relação estatisticamente significativa.

Quanto aos graus de malignidade tumoral e as respectivas medianas de idades da população acometida, houve significância estatística entre os graus I e II ($p=0,0191$). Os dados indicam que na casuística do presente estudo, os indivíduos mais jovens (≤ 40 anos) foram acometidos por grau de malignidade tumoral mais avançado (grau II) em relação aos indivíduos mais idosos (grau I).

5.2 Análise germinativa do polimorfismo *rs12979860* C/T no gene da *IL28B*

A casuística do presente estudo foi agrupada de acordo com os genótipos para o polimorfismo *rs12979860* (CC, TT e CT).

Dentre os casos, os genótipos homozigotos CC e TT foram observados em 30% e 20% dos pacientes, respectivamente. Os pacientes heterozigotos representaram 50% dessa casuística.

As frequências alélicas e genóticas distribuídas entre os sexos são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo *rs12979860* do gene da *IL28B*, distribuídas por sexo.

	Feminino (n=38)	Masculino (n=22)	Total (n=60)	P-value*
Genótipos	Frequência Genotípica			
CC	10 (26,3%)	8 (36,4%)	18 (30%)	0.5565*
CT	19 (50%)	11 (50%)	30 (50%)	
TT	9 (23,7%)	3 (13,6%)	12 (20%)	
Alelos	Frequência Alélica			
C	39 (51,3%)	27 (61,4%)	66 (55%)	0.3427*
T	37 (48,7%)	17 (38,6%)	54 (45%)	

n= número de casos analisados.

* Teste Exato de Fisher: Considera-se $p \leq 0.05$ = relação estatisticamente significativa.

Conforme apresentado na tabela 8, não houve relação estatisticamente significativa entre as frequências genotípica ou alélica e sexo ($p=0.5565$ e 0.3427 , respectivamente).

Para a obtenção da frequência desses alelos na população brasileira (grupo considerado controle), foi realizada uma revisão bibliográfica por artigos publicados nos últimos cinco anos que analisaram o polimorfismo em grupos-controle compostos por brasileiros doadores de sangue. Foram obtidos três trabalhos com essas características. A tabela 9 apresenta as frequências genotípica e alélica do polimorfismo nessas populações.

Tabela 9. Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *rs12979860* C/T do gene *IL28B* em doadores de sangue brasileiros.

População Estado de Origem		Frequência	Referência
Genótipos			
CC	Santa Catarina (n=198)	47,4%	Garcia et al., 2014
	São Paulo (n=240)	43,8%	Ferreira, 2013
	Santa Catarina (n=75)	52,0%	Moreira et al., 2012
CT	Santa Catarina (n=198)	43,7%	Garcia et al., 2014
	São Paulo (n=240)	41,7%	Ferreira, 2013
	Santa Catarina (n=75)	40,0%	Moreira et al., 2012
TT	Santa Catarina (n=198)	8,9%	Garcia et al., 2014
	São Paulo (n=240)	14,6%	Ferreira, 2013
	Santa Catarina (n=75)	8,0%	Moreira et al., 2012
Alelos			
C	Santa Catarina (n=198)	69,0%	Garcia et al., 2014
	São Paulo (n=240)	64,0%	Ferreira, 2013
	Santa Catarina (n=75)	72,0%	Moreira et al., 2012
T	Santa Catarina (n=198)	31,0%	Garcia et al., 2014
	São Paulo (n=240)	35,4%	Ferreira, 2013
	Santa Catarina (n=75)	28,0%	Moreira et al., 2012

n= número de casos analisados.

Para comparação das frequências genotípicas e alélicas entre os casos de meningiomas analisados e indivíduos saudáveis, foram utilizadas informações do banco de dados genômicos (dbSNP) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs12979860>). Tais dados são baseados nos resultados provenientes do projeto internacional "Projeto 1000 Genomas" (ABECASIS et al., 2010) que realizou o sequenciamento do genoma completo de pelo menos 1.000 indivíduos de diferentes etnias, estudados em todo o mundo.

A análise comparativa entre as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo *rs12979860* C/T, obtidas com as análises do presente estudo e também de dados disponíveis na literatura e no banco de dados dbSNP está representada na tabela 10.

Tabela 10. Análise da frequência genotípica e alélica dos casos de meningiomas e dos indivíduos sadios (brasileiros e do banco de dados *dbSNP*).

Indivíduos saudáveis (brasileiros e de bancos de dados abertos):				
	Meningioma	Brasil*	dbSNP**	P-value***
Genótipos				
CC	30%	43,8 a 52%	ND*	0.0240
CT	50%	40 a 43,7%	ND*	
TT	20%	8 a 14,6%	ND*	
Alelos				
C	55%	64 a 72%	64%	0.0809
T	45%	28 a 35,4%	36%	

*Garcia et al., 2014; Ferreira, 2013; Moreira et al., 2012; **dbSNP: www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP;

***Teste Chi-quadrado: Considera-se $p \leq 0.05$ = relação estatisticamente significativa; ND*: dados não disponíveis

Pode-se observar que as frequências dos genótipos TT e CT foram maiores nos pacientes acometidos por meningioma quando comparadas com as observadas entre os indivíduos brasileiros elencados como controles sadios ($p = 0.0240$). Essa associação também é sugerida pela frequência discretamente elevada do alelo T (45%) na casuística em relação ao grupo controle ($p = 0.0809$). Resultados similares podem ser observados quanto aos dados de genótipos mundiais (dbSNP).

5.3 Sequenciamento dos genes *IL28B* e *IL28R1*

Para investigação de novas variações genéticas no *IL28B*, foi realizado o sequenciamento completo deste gene, utilizando os *primers* (A, B, C e D) que juntos e sobrepostos, abrangem toda a sua extensão (1401 pares de bases).

O gene *IL28R1* teve somente suas regiões codificantes sequenciadas e analisadas, devido a sua grande extensão.

Após o sequenciamento, a qualidade das sequências obtidas foi analisada com o programa *Phred* (EWING et al., 1998; EWING et al., 1998a), adotando-se o score 20 para a validação do sequenciamento.

Na tabela 11, estão representados os scores, a probabilidade de inserções de bases erradas e a fidelidade dos dados obtidos de acordo com o *Software Phred*.

Tabela 11. Score de qualidade e as respectivas características das sequencias analisadas pelo software Phred*

<i>Phred Score</i>	<i>Probabilidade de inserção de bases erradas</i>	<i>Fidelidade das reações</i>
10	1 base em 10	90%
20	1 base em 100	99%
30	1 base em 1000	99,9%
40	1 base em 10.000	99,99%
50	1 base em 100.000	99,999%

* Ewing et al., 1998; Ewing et al., 1998^a.

As sequências de boa qualidade, de acordo com os parâmetros do *software* Phred, foram tratadas e comparadas às sequencias referência depositada no GeneBank (*IL28B*: NC_19.9 e *IL28R1*: NC_01.11), utilizando-se o *software* *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL et al., 1999).

A figura 4 ilustra um eletroferograma representativo do registro gráfico da eletroforese por capilar, sendo possível identificar as bases nitrogenadas e seus respectivos sinais ao longo da corrida.

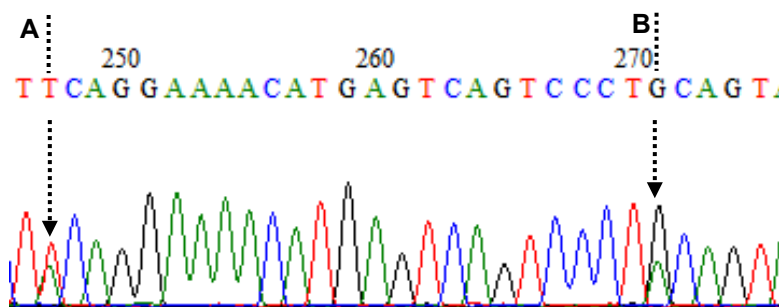


Figure 4. Eletroferograma ilustrativo da sequência parcial de nucleotídeos na região genômica equivalente ao Fragmento C do gene *IL28B*. A sequência exibe variação genética em heterozigose (T/C) e (G/A), evidenciada pela sobreposição dos picos na mesma posição nucleotídica, indicadas pelas setas A e B respectivamente.

a) **Análise do gene *IL28B***

Com base nas sequências analisadas para o gene da *IL28B*, juntamente com a sua sequência referência (NC_19.9) numerosas variações genéticas em toda a sua extensão, tanto nas regiões codificantes (exons 1, 2, 3, 4 e 5) como naquelas não codificantes (introns 1, 2, 3 e 4) foram encontradas (Tabela 12).

Tabela 12. Análise das variações genéticas germinativas observadas no gene *IL28B* em pacientes acometidos por meningioma.

Região Gênica	Variação	Posição Genoma	Código Genético	Aminoácido	Mutação	RNA _m	Proteína	Frequência Absoluta	Observação	Significância Fenotípica
5' UTR	G>C	G3C	CTG>CTC	-	-	-	-	46 hom/12 het	ND*	ND*
	T>C	T7C	TCC>CCC	-	-	-	-	2 hom/ 54 het	ND*	ND*
EXON 1	C>G	C44G	ACC>AGC	Thr>Ser	<i>missense</i>	C5G	T2S	1 het	rs202126177	ND*
	C>T	C45T	ACC>ACT	Thr>Thr	<i>silent</i>	C6T	T2T	2 hom/56 het	rs630388	ND*
	T>C	T56C	ATG>ACT	Met>Thr	<i>missense</i>	T17C	M6T	7 hom/50het	rs71356848	ND*
	G>C	G63C	GTG>GTC	Val>Val	<i>silent</i>	G24C	V8V	1 het	ND*	ND*
	G>C	G84C	GTG>GTC	Val>Val	<i>silent</i>	G45C	V15V	1 het	ND*	ND*
	T>C	T96C	ACT>ACC	Thr>Thr	<i>silent</i>	T57C	T19T	1 het	ND*	ND*
	G>C	G98C	GGA>GCA	Gly>Ala	<i>missense</i>	G59C	G20A	3 heter	rs148017150	ND*
	C>T	C111T	GTC>GTT	Val>Val	<i>silent</i>	C72T	V24V	1 het	rs200909158	ND*
	G>T	G117T	AGG>AGT	Arg>Ser	<i>missense</i>	G78T	R26S	1 het	rs772101792	ND*
	G>A	G122A	CGC>CAC	Arg>His	<i>missense</i>	G83A	R28H	8 hom/43 het	rs629976	ND*
	C>T	C123T	CGC>CGT	Arg>Arg	<i>missense</i>	C84T	R28R	1 het	rs201540002	ND*
	A>C	A167C	AAG>ACG	Lys>Thr	<i>missense</i>	A128C	K43T	2 het	ND*	ND*
	A>C	A200C	TAA>TCA	Lys>Thr	<i>missense</i>	A161C	K54T	1 het	ND*	**S
	G>C	G211C	GAT>CAT	Asp>His	<i>missense</i>	G172C	D58H	2 het	rs371708541	**S
INTRON 1	G>C	G234C	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	G>T	G242T	-	-	-	-	-	1 hom	ND*	ND*
	T>G	T256G	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	G>C	G263C	-	-	-	-	-	11 het	rs199950179	ND*
	G>C	G273C	-	-	-	-	-	9 het	rs368072808	ND*
	T>C	T308C	-	-	-	-	-	6 het	ND*	ND*
	G>A	G311A	-	-	-	-	-	1 het	rs142118702	ND*
	C>T	C351T	-	-	-	-	-	3 het	ND*	ND*
	C>T	C357T	-	-	-	-	-	11 het	rs629008	ND*
	A>C	A366C	-	-	-	-	-	2 het	ND*	ND*
	T>C	T373C	-	-	-	-	-	2 het	ND*	ND*

	A>T	A381T	-	-	-	-	-	1 hom/11het	rs628973	ND*
	A>C	A382C	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	C>T	C429T	-	-	-	-	-	2 het	ND*	ND*
	T>C	T454C	-	-	-	-	-	15 het	ND*	ND*
	A>G	A458G	-	-	-	-	-	16 het	ND*	ND*
	G>A	G459A	-	-	-	-	-	16 het	ND*	ND*
	G>T	G462T	-	-	-	-	-	1 het	rs140489681	ND*
	C>T	C483T	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	G>A	G485A	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	G>C	G498C	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	G>C	G504C	-	-	-	-	-	4 het	ND*	ND*
	T>C	T454C	-	-	-	-	-	15 het	ND*	ND*
	A>G	A458G	-	-	-	-	-	16 het	ND*	ND*
	G>A	G459A	-	-	-	-	-	16 het	ND*	ND*
	G>T	G462T	-	-	-	-	-	1 het	rs140489681	ND*
	C>T	C483T	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	G>A	G485A	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	G>C	G498C	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	G>C	G504C	-	-	-	-	-	4 het	ND*	ND*
EXON 2	A>G	A541G	AAG>AGG	Lys>Arg	missense	A209G	K70R	14 hom/27 het	rs8103142	ND*
	G>A	G547A	CGC>CAC	Arg>His	missense	G215A	R72H	1 hom/11het	rs201418207	**S
INTRON 2	C>G	C633G	-	-	-	-	-	32 het	ND*	ND*
	T>C	T634C	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	C>T	C635T	-	-	-	-	-	2 het	rs8102358	ND*
	T>G	T639G	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	C>T	C659T	-	-	-	-	-	60 het	rs567322623	ND*
	T>G	T663G	-	-	-	-	-	57 het	rs556019038	ND*
	C>T	C668T	-	-	-	-	-	57 het	rs537937279	ND*
	A>C	A675C	-	-	-	-	-	4 het	ND*	ND*
	C>T	C681T	-	-	-	-	-	57 het	ND*	ND*

C>T	C689T	-	-	-	-	-	56 het	ND*	ND*
C>T	C695T	-	-	-	-	-	54 het	ND*	ND*
A>C	A706C	-	-	-	-	-	56 hom/4 het	ND*	ND*
C>T	C707T	-	-	-	-	-	58 het	ND*	ND*
T>C	T718C	-	-	-	-	-	59 het	rs564786597	ND*
G>A	G719A	-	-	-	-	-	60 het	ND*	ND*
T>C	T724C	-	-	-	-	-	56 hom/ 4 het	rs11881222	ND*
C>T	C736T	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
C>T	C760T	-	-	-	-	-	60 het	ND*	ND*
G>C	G775C	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
C>A	C796A	-	-	-	-	-	54 het	ND*	ND*
del-1C	797del C	-	-	-	-	-	54 heter	rs200467171	ND*
A>C	A798C	-	-	-	-	-	53 het	ND*	ND*
A>G	A799G	-	-	-	-	-	51 het	rs762411162	ND*
C>T	C800T	-	-	-	-	-	60 het	ND*	ND*
C>T	C801T	-	-	-	-	-	55 het	ND*	ND*
T>G	T802G	-	-	-	-	-	6 hom/42 het	ND*	ND*
G>T	G803T	-	-	-	-	-	4 het	rs775131526	ND*
T>C	T805C	-	-	-	-	-	22 het	ND*	ND*
C>T	C809T	-	-	-	-	-	6 hom/3 het	ND*	ND*
T>C	T810C	-	-	-	-	-	2 het	ND*	ND*
C>A	C811A	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
A>C	A812C	-	-	-	-	-	43 het	rs201120334	ND*
C>T	C814T	-	-	-	-	-	3 hom/2 het	ND*	ND*
T>C	T815C	-	-	-	-	-	59 hom/1 het	rs770519689	ND*
C>G	C816G	-	-	-	-	-	2 het	rs561804461	ND*
C>T	C821T	-	-	-	-	-	5 hom/ 1 het	rs200419716	ND*
T>C	T822C	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
C>A	C823A	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
A>C	A824C	-	-	-	-	-	24 het	rs375841887	ND*
C>T	C826T	-	-	-	-	-	11 hom/1 het	ND*	ND*
T>G	T827G	-	-	-	-	-	25 hom/1 het	ND*	ND*

	C>T	C829T	-	-	-	-	-	26 hom/11 het	ND*	ND*
	T>C	T830C	-	-	-	-	-	5 hom	ND*	ND*
	C>T	C831T	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	T>C	T834C	-	-	-	-	-	1 het	ND*	ND*
	C>T	C835T	-	-	-	-	-	1 hom	rs753899626	ND*
	T>C	T836C	-	-	-	-	-	4 hom	rs551195722	ND*
	C>T	C840T	-	-	-	-	-	22 hom	ND*	ND*
	T>C	T841C	-	-	-	-	-	22 hom	ND*	ND*
	C>T	C842T	-	-	-	-	-	1 hom	ND*	ND*
	T>C	T843C	-	-	-	-	-	1 hom	ND*	ND*
	C>T	C845T	-	-	-	-	-	58 hom	rs199693585	ND*
EXON 3	G>T	G850T	GTG>TTG	Val>Leu	missense	G259T	V87L	5 het	ND*	ND*
	T>G	T851G	GTG>GGG	Val>Gly	missense	T260G	V87G	32 hom/8 het	ND*	ND*
	G>A	G852A	GTG>GTA	Val>Val	silent	G261A	V87V	34 hom	ND*	ND*
	G>A	G856A	GAG>AAG	Glu>Lys	missense	G265A	E89K	49 hom	ND*	ND*
	G>C	G858C	GAG>GAC	Glu>Asp	missense	G267C	E89D	50 het	ND*	ND*
	C>G	C859G	CGC>GGC	Arg>Gly	missense	C268G	R90G	1 hom/5 het	ND*	ND*
	G>C	G860C	CGC>CCC	Arg>Pro	missense	G269C	R90P	5 hom/6 het	rs144570763	ND*
	C>T	C864A/T	CCC>CCA/T	Pro>Pro	silent	C273A/T	P91P	42 hom/10 het	rs528458265	ND*
	T>G	T866G	GTG>GGG	Val>Gly	missense	T275G	V92G	44 hom/2 het	ND*	ND*
	G>C	G868C	GCT>CCT	Ala>Pro	missense	G277C	A93P	57 het	ND*	ND*
	C>T	C869T	GCT>GTT	Ala>Val	missense	C278T	A93V	43 hom/7 het	ND*	ND*
	G>A	G874A	GAG>AAG	Glu>Lys	missense	G283A	E95K	48 hom/5 het	ND*	ND*
	G>C	G877C	GCT>CCT	Ala>Pro	missense	G286C	A96P	6 het	ND*	ND*
	C>T	C878T	GCT>GTT	Ala>Val	missense	G287T	A96V	28 hom/15 het	ND*	ND*
	G>A	G880A	GAG>AAG	Glu>Lys	missense	G289A	E97K	45 hom	ND*	ND*
	G>C	G882C	GAG>GAC	Glu>Asp	missense	G291C	E97D	60 het	ND*	ND*
	C>T	C883T	CTG>TTG	Leu>Leu	silent	C292T	L98L	39 hom/3 het	ND*	ND*
	G>C	G886C	GCC>CCC	Ala>Pro	missense	G295C	A99P	47 het	ND*	ND*
	G>A	G891A	CTG>CTA	Leu>Thr	missense	G300A	L100T	25 hom	ND*	ND*
	C>G	C893G	ACG>AGG	Thr>Arg	missense	C302G	T101R	27 het	ND*	ND*
	G>C	G894C	ACG>ACC	Thr>Thr	silent	G303C	T101T	60 hom	ND*	ND*

INTRON 3	G>T	G1058T	-	-	-	-	-	1 het	rs188088762	ND*
EXON 4	C>T	C1157T	CAC>TAC	His>Tyr	<i>missense</i>	C466T	H156Y	3 het	rs139076671	ND*
	G>C	G1162C	CGG>CGC	Arg>Arg	<i>silent</i>	G471C	R157R	1 het	ND**	ND*
	C>A	C1163A	CTC>ATC	Leu>Ile	<i>missense</i>	C472A	L158I	1 het	ND**	ND*
EXON 5	T>A	T1293A	CTC>CAC	Leu>His	<i>missense</i>	T509A	L170H	1 het	ND**	ND*
	A>T	A1296T	GAG>GTG	Glu>Val	<i>missense</i>	A512T	E171V	1 het	rs759937600	ND*

hom = homozigoto; het = heterozigoto; *ND* = não descrito; **S = o polimorfismo provocou redução da atividade da citocina na via imunológica antiviral (GAD et al., 2009).

Após análises nos bancos de dados públicos de variações genéticas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), foi possível a distinção entre as variantes inéditas e as já descritas. Com o presente estudo, foram identificadas 27 novas variações genéticas e 74% destas provocam a troca de aminoácidos (*missense*) na sequência primária proteica.

Em uma análise global (variações descritas e inéditas), 75,6% das variações são do tipo *missense*.

Para melhor visualização, as variações genéticas *missense* foram esquematicamente distribuídas ao longo da estrutura secundária da proteína codificada pelo gene *IL28B*. Parte dos aminoácidos substituídos estão localizados nos domínios de ligação da proteína ao seu receptor, como por exemplo as variações K54T, D58H, R72H (marcadas por elipses vermelhas), descritas na figura 5.

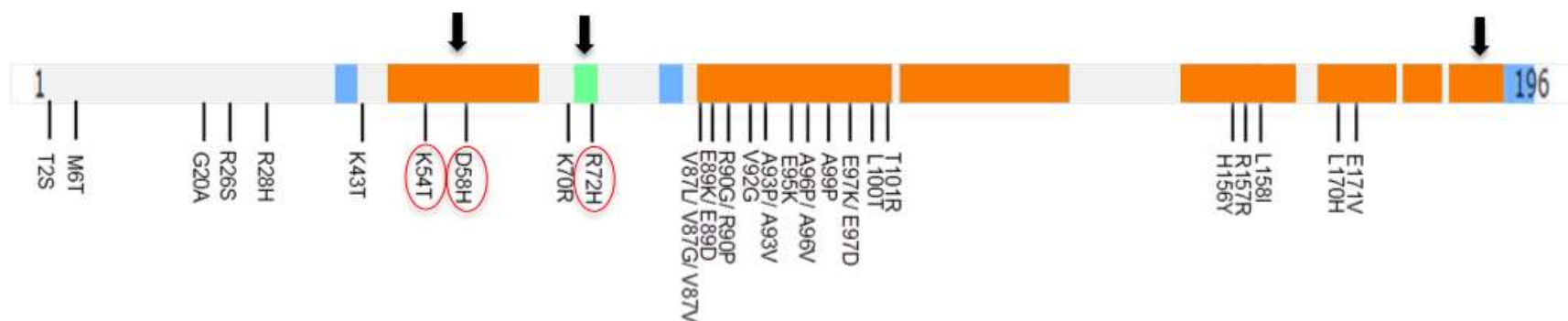


Figura 5: Ilustração da distribuição das mutações *missense* ao longo da estrutura secundária da *IL28B* detectadas em pacientes acometidos por meningioma.

Legenda: Retângulos azuis e laranjas simbolizam as hélices e alfa-hélices, respectivamente e os retângulos verdes representam as cadeias beta na estrutura protéica secundária; os números indicam as posições dos aminoácidos. Peptídeo sinal (1-21 aa); As setas indicam as hélices que provavelmente compõem o domínio de ligação ao Receptor R1; As mutações marcadas por elipses vermelhas reduzem, *in vitro*, a atividade antiviral. Adaptado de <http://www.uniprot.org/>

b) Análise do gene *IL28R1*

Para a análise das regiões codificantes do gene *IL28R1*, a sequência referência utilizada foi NC_01.11 e as variações genéticas detectadas na presente casuística estavam distribuídas entre os exons 1, 3, 4, 5 e 7. Não foram observadas mutações nos exons 2 e 6 (Tabela 13).

Tabela 13. Análise das variações genéticas encontradas na região codificante do gene da *IL28R1* e suas principais características.

Região	Variação	Posição Genoma	Código Genético	Aminoácidos	Mutação	RNA _m	Proteína	Frequência Absoluta	Observação	Significância Fenotípica
Exon 1	C>G	C43G	CGC>GGC	Arg>Gly		C16G	R6G	1 heter	rs139958347	ND*
Exon 3	C>T	C17681T	CAC>TAC	His>Tyr		C189T	H63Y	1 hom T 4 heter	rs34654982	ND*
	C>T	C17716T	GCG>GTG	Ala>Val		C224T	A75V	1 heter	rs115773768	ND*
	G>T	G17798T	GGT>TGT	Gly>Cys		G406T	G135C	1 heter	rs78627520	ND*
	G>C	G25632C	AGG>AGC	Arg>Ser		G408C	R136S	1 heter	ND*	ND*
Exon 4	G>A	G25635A	AGA>AAA	Arg>Lys		G411A	E137K	1 heter	rs148521759	ND*
	G>C	G25673C	GCA>CCA	Ala>Pro		G449C	A150P	2 heter	rs141989044	ND*
Exon 5	C>G	C27770G	TCT>TGT	Ser>Cys		C638G	S213C	1 heter	ND*	ND*
Exon 7	A>G	A29532G	AGA>GGA	Arg>Gly		A866G	R289G	1 heter	ND*	ND*
	A>T	A29581T	GAC>GTC	Asp>Val		A915T	D305V	1 heter	ND*	ND*
	C>T	C29658T	CAC>CTC	His>Leu		C1041T	H347L	1 heter	rs72648587	ND*
	C>T	C29956T	CCG>CTG	Pro>Pro		C1290T	P430P	1 heter	rs746191540	ND*
	T>C	T30123C	TTG>CTG	Leu>Leu		T1457C	L486L	1 heter	rs59631801	ND*

Legenda: hom = homozigoto; het = heterozigoto; ND* = não descrito

Após análises nos bancos de dados públicos de variações genéticas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), foi possível a distinção entre as variantes inéditas e as já descritas. Foram identificadas três novas variações genéticas e todas provocam a troca de aminoácidos (*missense*) na sequência primária proteica.

Em uma análise global (variações descritas e inéditas), 85% das variações são do tipo *missense*.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os meningiomas são tumores mais frequentes do SNC e, apesar de benignos e de crescimento lento, devem ser considerados graves de acordo com a localização tumoral e a capacidade de recidiva caso a ressecção cirúrgica seja incompleta (LUSIS; GUTMANN, 2004; DREVELEGAS, 2005; SUAREZ, et al., 2012; ABTA, 2014).

O papel do sistema imunológico na prevenção ao surgimento e progressão de tumores tem sido alvo de estudos no campo da imunologia tumoral (de VISSER et al., 2006), uma vez que processos patológicos incluindo o câncer, podem ser promovidos e/ou sustentados pela diminuição ou excesso de resposta imunológica de um indivíduo.

Até o presente momento não foi esclarecida a importância dos mecanismos imunológicos na tumorigênese e/ou progressão dos meningiomas e o presente estudo teve como objetivo a investigação de variações nos genes *IL28B* e em seu receptor *IL28R1*.

O polimorfismo *rs12979860* (C/T), localizado na região não codificante 5'UTR do gene *IL28B* tem sido amplamente estudado em todo o mundo. Diversos estudos demonstraram forte associação do genótipo CC tanto com uma melhor resposta ao tratamento da hepatite C quanto com a manutenção da resposta virológica sustentada (THOMAS, 2009; FABRIS, et al., 2011; BIBERT, et al., 2013). É sabido que a resposta imune antiviral é similar em vários aspectos, à resposta antitumoral. Contudo, são escassas as investigações sobre a associação desse polimorfismo com a ocorrência de tumores e, quando presente, a abordagem é restrita ao hepatocarcinoma associado à infecção pelo vírus C (CAO, et al., 2014).

De maneira inédita, o presente estudo evidenciou a maior frequência do alelo T nos indivíduos acometidos por meningioma, quando comparados ao grupo controle de doadores de sangue brasileiros (FERREIRA, 2013; GARCIA, et al., 2014; PAR, et al., 2014) e ao banco de dados genômicos mundial (dbSNP; ABECASIS et al., 2010). Tendo em vista que o alelo T parece reduzir a expressão do RNAm do *IL28B* (XIE, et al., 2012; BELLANTI, et al., 2012), esses resultados sugerem que a redução da expressão dessa proteína contribua para algum dos mecanismos de tumorigênese meningotelial, ou para a falha de reconhecimento

tumoral pelo sistema imune, uma vez que essa interleucina (IFN- λ), quando ligada ao receptor *IL28R1*, desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, promovendo o aumento da expressão de MHC I. Além disso, provoca o aumento da atividade fagocítica das APCs, a indução das *Natural Killer* (NK), a quimiotaxia de células T CD4+, além do reconhecimento e ativação dos linfócitos T CD8+. Assim, indivíduos portadores do genótipo TT poderiam ser mais susceptíveis ao meningioma do que aqueles portadores do genótipo CC.

Sato e colaboradores (2006), investigaram a atividade antitumoral de IL29B nas linhagens celulares murinas melanoma (B16) e tumores de colon (Colon26). A transdução de cDNA-IL28B promoveu o aumento na expressão de MHC I e o aparecimento de antígenos de superfície Fas (CD95) nas células B16. A superprodução de *IL28B* suprimiu a proliferação *in vitro* pela indução de p21 e desfosforilação de Rb, resultando no aumento da atividade das caspases, o que sugere sua ação via apoptose e supressão do ciclo celular. Ainda, a injeção terapêutica de cDNA-IL28 em um fígado com células metastáticas (Colon26) promoveu a inibição do crescimento do tumor, *in vivo*, pelo aumento do número de células *Natural Killer*.

Outras variações genéticas encontradas no gene da *IL28B*, do presente estudo, ocorreram em regiões codificantes (exons) e não codificantes (introns) (tabela 14). Dentre elas, 27 ainda não haviam sido descritas. É digno de nota que 74% são mutações *missense*, despertando o interesse para estudos futuros, *in vitro* e *in silico*, sobre o papel dessas alterações na função protéica.

Gad e colaboradores (2009) estimaram a estrutura cristalográfica da *IL28B* e sugeriram um modelo para a interação com o seu receptor (*IL28R1*). Nesse mesmo estudo, demonstraram que algumas mutações nas regiões de interação proteína-receptor, provocadas *in vitro*, reduziam a atividade antiviral dessa citocina. Foi observado, em nosso estudo, três mutações descritas por Gad e colaboradores (2009): as variações K54T (lisina>treonina), D58H (ácido aspártico>histidina) e R72H (arginina>histidina) que reduzem a atividade antiviral em 38x, 43x e 1x, respectivamente.

As variações *missense* identificadas, distribuídas esquematicamente ao longo da estrutura secundária da proteína *IL28B* reforça a provável importância dessas alterações na função proteica (Figura 5), uma vez que, parte dos

aminoácidos substituídos estão localizados nos domínios de ligação da proteína ao seu receptor (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8IZI9#section>).

Várias dessas substituições provocaram a troca de aminoácidos por outro que pertencia a grupos moleculares de polaridades distintas (dados não apresentados). Contudo, outras análises devem ser conduzidas para a determinação das possíveis implicações das variações encontradas, que ainda não tinham sido descritas.

Para a análise do gene que codifica o receptor *IL28R1* optou-se por sequenciar somente as regiões codificantes, visto tratar-se de uma região extensa (33.119pb). As variações genéticas detectadas na presente casuística estavam distribuídas entre os exons 1, 3, 4, 5 e 7. Foram identificadas três variações genéticas que não estavam ainda descritas nos Bancos de Dados Genômicos Públicos e todas provocam a troca de aminoácidos na sequência primária protéica.

Embora o efeito antiproliferativo induzido por *IL28B* tenha sido demonstrado em linhagens celulares (BRAND et al., 2005; MEAGER et al., 2005; ZITZMANN et al., 2006; GAD et al., 2009), essa atividade depende do nível de expressão do seu receptor celular (LASFAR; COHEN-SOLAL, 2011) e da conservação de seus domínios principais. O receptor funcional é constituído por duas cadeias, *IL28R1* e *IL10R2*. O *IL28R1* é exclusivo para os IFN-lambdas e sua distribuição nos tecidos é muito restrita. Em contraste, a cadeia *IL10R2* é partilhada como receptor para IL10, IL22 e IL26, além de ser expresso na maioria dos tecidos. Witte e colaboradores (2009) observaram níveis variados de expressão de *IL28R1* em diferentes tecidos, desde elevada expressão no trato gastrointestinal e pulmão até níveis reduzidos no tecido cerebral. Células endoteliais, adipócitos e fibroblastos parecem não expressar o receptor *IL28R1* (LASFAR; COHEN-SOLAL, 2011).

Em um análise global (variações descritas e inéditas), 85% das variações são do tipo *missense* e é digno de nota que 64% dessas variações estão localizadas entre os aminoácidos 21 e 228, que compõem o domínio extracelular do receptor (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8IU57>).

Os achados do presente trabalho estimulam análises futuras para avaliar se as alterações encontradas podem interferir na estrutura tridimensional das proteínas e na ligação da *IL28B* ao receptor *IL28R* (*in silico*) e auxiliar na identificação dos mecanismos pelos quais seriam ativadas/desativadas proteínas da cascata de sinalização intracelular de respostas a citocinas.

*Referências
Bibliográficas*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Imunidade Tumoral. In: **Imunologia Celular e Molecular**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, cap. 17, p. 300-315.

ABECASIS, G.R.; ALTSHULER D.; AUTON, A. et al. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. Genomes Project Consortium (2010). **Nature**, 2010, v.467, p.1061–1073.

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION (ABTA), Gliomas. Chicago, 2012. Disponível em:<<http://www.abta.org/understanding-brain-tumors/types-of-tumors/gliomas.html>>. Acesso em: 20 jul.2012.

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION (ABTA). Meningiomas. Chicago, 2014. Disponível em:<<http://www.abta.org/brain-tumor-information/diagnosis/malignant-benign-brain-tumors.html>>. Acesso em 15 nov.2014.

AMIN, A.; WHITE, R.J. JR. High-dose interleukin-2: is it still indicated for melanoma and RCC in an era of targeted therapies? *Oncology*. 2013, v.27, n.7, p. 680-91.

ANIC, G.M. et al. Reproductive factors and risk of primary brain tumors in women. **Journal of Neurooncology**, 2014, v.118, n2, p.297-304.

ANK, N.; WEST, H.; PALUDAN, S. R. INF- λ : Novel Antiviral Cytokines. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, 2006, v.26, p. 376-379.

ASAHINA, Y. et al. Association of Gene Expression Involving Innate Immunity and Genetic Variation in Interleukin 28B with Antiviral Response. **Hepatology**, 2012, v.55, n.1, p.20-29.

BELLANTI, F. et al. The Impact of Interferon Lambda 3 Gene Polymorphism on Natural Course and Treatment of Hepatitis C. **Clinical and Developmental Immunology**, 2012.

BIBERT, S. IL28B expression depends on a novel TT/-G polymorphism which improves HCV clearance prediction. **The Journal of Experimental Medicine**, 2013, v. 210, n.6, p. 1109-1116.

BRAND, S. et al. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. **American Journal Physiology**, 2005, v. 289, p.960-968.

BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL. **WHO 2000 Classification of Meningiomas**. Boston, 2012. Disponível em: <http://www.brighamandwomens.org/Departments_and_Services/neurosurgery/meningioma/WHOclassification.aspx>. Acesso em 03 ago 2012.

BUETOW, M.P.; BUETOW, P.C.; SMIRNIOTOPOULOS, J.G. Typical, atypical, and misleading features in meningioma. **Radiographics**, 1991, v. 11, p.1087-1106.

CAO, X.; DING, O.; TAO, W. et al. MDA5 Plays a Critical Role in Interferon Response during Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Hepatology**, 2014.

CENTRAL BRAIN TUMOR REGISTRY OF THE UNITED STATES (CBTRUS).CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2008. Disponível em:< http://www.cbtrus.org/2012-NPCR-SEER/CBTRUS_Report_2004-2008_3-23-2012.pdf>. Acesso em 20 nov. 2014.

CLAUS, E.B. et al. Epidemiology of intracranial meningioma. **Neurosurgery**, 2005, v. 57, n. 6. p.1088-1095.

DAFNY, N.; YANG, P. B. Interferon and the central nervous system. **Science Direct**, 2005, v. 523, p.1-15.

DANGELO, J. G.; FATINI, C. A. **Anatomia Humana Básica**, São Paulo: Atheneu, 2008. CD-ROM.

deVISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, 2006, v.6, p.24-37.

DOYLE, S.E. et al. Interleukin-29 Uses a Type 1 Interferon-Like Program to Promote Antiviral Responses in Human Hepatocytes. **Hepatology**, 2006, v. 44, n. 4.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, 2004, v. 4, p.11-22.

DREVELEGAS, A. Extra-axial brain tumors. **European radiology**, v. 15, n. 3, p. 453-467, 2005.

DUMOUNTIER, L. et al. Role of the Interleukin (IL)-28 Receptor Tyrosine Residues for Antiviral and Antiproliferative Activity of IL-29/Interferon- λ 1. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004, v.279, n.31.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Cytokines and Advanced Cancer. **Journal of Pain and Symptom Manage**, 2000, v.20, n.3, p.214-234.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy Assessment .**Genome Research**, v.8, n.3, p.175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, n.3, p.186-194, 1998a.

FABRIS, C. et al., IL-28B rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: Role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. **Journal of Hepatology**.V.54, Italia: 2011.

FERREIRA, C.S. **Frequência do polimorfismo rs12979860, no gene da IL28B, em pacientes portadores de Hepatite C crônica e em controles sadios: Uma nova metodologia de baixo custo e menor tempo para genotipagem.** Dissertação de Mestrado, 2014.

FOX, B. .; SHEPP RD, P.O.; O'H R , P.J. The Role of Genomic Data in the Discovery, Annotation and Evolutionary Interpretation of the Interferon-Lambda Family. **PLoS ONE**, 2009, v. 4, n.3, 2009.

FUNG, S.K.; LOK, A.S. Treatment of chronic hepatitis B: who to treat, what to use, and for how long?. **Clinical Gastroenterology and. Hepatology**, 2004, v. 2, n. 10, p.839–848.

FUKUHARA, T.; ABE, T.; TAKETOMI, A. et al. Variants in *IL28B* in Liver Recipients and Donors Correlate With Response to Peg-Interferon and Ribavirin Therapy for Recurrent Hepatitis C. **Gastroenterology**, 2010,v.139, p.1577–1585.

GARCIA, R.F.L.; MOREIRA, S.; RAMOS, A.L.A. et al. Interleukin 28B-related polymorphisms: A pathway for understanding hepatitis C virus infection? **World Journal of Gastroenterology**, 2013, v.19, n.42, p.7399-7404.

GLOBOCAN. **Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide**, 2008. Disponível em:<http://globocan.iarc.fr/burden.asp?selection_pop=220900&Text=p=World&selection_cancer=2220&Text=Brain%2C+nervous+system&pYear=2&type=0&window=1&submit=%A0Execute%A0>. Acesso em 28 jul 2012.

GOODBURN, S.; DIDCOCK, L.; RANDAL, R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. **Journal of General Virology**, 2000, v.81, n. 10, p.2342-2364.

GU, J. et al. Molecular Epidemiology of Primary Brain Tumors. Neurotherapeutics: **The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, 2009, v. 6, n. 3, p. 427–435.

GUENTERBERG, K.D. et al. Interleukin-29 binds to melanoma cells inducing Jak-STAT signal transduction and apoptosis. **Molecular Cancer Therapeutics**, 2010, v. 9, n.2, p. 510-520.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, 1999, n.41, p. 41, p.95-98.

HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; MYÖHÄNEN, S.; NELKIN, B.D.; BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, n.18, p.9821-9826, 1996.

HEIM, M.H. Interferons and hepatitis C vírus. **Swiss Medical Weekly**, 2012, v. 9.

HSU, D.W.; EFIRD, J.T.; HEDLEY-WHYTE, E.T. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. **Journal of Neurosurgery**, 1997, v. 86, p. 113–20.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2012: **Incidência de Câncer no Brasil**, 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>>. Acesso em: 28 jul 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil**, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>>. Acesso em: 20 nov 2014.

KIRKWOOD, J. M. et al. High-dose interferon alfa-2b does not diminish antibody response to GM2 vaccination in patients with resected melanoma: results of the multicenter eastern cooperative oncology group phase II trial E2696. **Journal of Clinical Oncology**, 2001, v.19, n.5, p.1430–1436.

KOTENKO, S.V. et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nature Immunology**, 2003, v.4, n.1, p.69–77.

LASFAR, A. et al. Interferon Lambda: A New Sword in Cancer Immunotherapy. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011.

LASFAR A, LEWIS-ANTES A, SMIRNOV SV, et al. Characterization of the mouse IFN- λ ligand-receptor system: IFN- λ s exhibit antitumor activity against B16 melanoma. **Cancer Research**, 2006; 66:4468-4477.

LI, M. et al. Interferon- λ s: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. **Journal of Leukocyte Biology**, 2009, v.86, n.1, p. 23-32.

LIN, S.C. et al. Profiling the expression of interleukin (IL)-28 and IL-28 receptor a in systemic lupus erythematosus patients. **European Journal of Clinical Investigation**, 2012, v.42, n.1, p.61-69.

LIU, T. C. et al. Epigenetic alteration of the *SOCS1* gene in chronic myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, 2003, v.123, n.4, p. 654-661.

LOUIS, D.N. et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. **Acta Neuropathologica**, 2007, v. 114, n.2, p.97-109.

LUSIS, E; GUTMANN, D. H. Meningioma: an update. **Current opinion in neurology**, v. 17, n. 6, p. 687-692, 2004.

MARCELLO, T. et al. Interferons α and λ Inhibit Hepatitis C Virus Replication With Distinct Signal Transduction and Gene Regulation Kinetics. **Gastroenterology**, 2006, v. 131, n.6.

MEAGER, A. et al. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. **Cytokine**, 2005, v. 31, n. 2, p. 109– 118.

MILLER, D.M. et al. Interferon lambda as a potential new therapeutic for hepatitis C. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009.

MONDELLI, M.U. et al.. Natural killer cell functional dichotomy: a feature of chronic viral hepatitis? **Frontiers in immunology**, 2012, v. 351, n. 3.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 04 de nov de 2014.

NISHIMURA, M.; NAITO, S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 2005, v. 28, p.886–892.

OWPPLI-BONY, A.; BOUVIER, G., RUE, M., LOISEAU, H. et al. Brain tumors and hormonal factors: review of the epidemiological literature. *Cancer Causes Control*, 2011, v. 22, n. 5, p.697–714.

PÁR, A.; PÁR, G.. IL28B and IL10R –1087 polymorphisms are protective for chronic genotype 1 HCV infection and predictors of response to interferon-based therapy in an East-Central European cohort. **BMC Research Notes**, 2014, 7:12.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; WALTER M.R.. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, 2004,v.202, p.8–32.

PIEMONTI, L.; ZERBI, A.; DI CARLO, V. Strategies For Tumor Immune Escape. **Drugs of Today**, Barcelona, 2003, v. 39, n.9, p.709-724.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2.344p.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, 1994, v.17, n.5, p.914-21.

SANTOS, R. et al.. Epidemiologia dos tumores do Sistema Nervoso Central, Hospital Nossa Senhora de Pompéia, Serviço de Neurocirurgia: A propósito de 100 casos estudados. **Revista Cientificada AMECS**, 2001, v. 10, n.1.

SCHNEIDER, T. et al. Gliomas in Adults. **Deutsches Ärzteblatt International**, 2010, v.107, n. 45, p. 799–808.

SHEPPARD, P. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nature Immunology**, 2003, v. 4, n. 1.

STARK, G.R. et al. HOW CELLS RESPOND TO INTERFERONS. **Annual Review of Biochemistry**, 1998, v. 67, p. 227-264.

STEEN, H.C.; GAMERO, A.M.. Interferon-lambda as a Potential Therapeutic Agent in Cancer Treatment. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, 2010, v. 30, n.8, p.579-602.

SUAREZ, C. et al.. Mathematical Modeling of Human Glioma Growth Based on Brain Topological Structures: Study of Two Clinical Cases. **Plos One, a peer-reviewed, open access journal**, 2012, v.7, n. 6.

SUTHERLAND, K.D. et al. Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas. **Oncogene**, 2004, v. 23, p.7726–7733.

TAGAWA, M. et al. A Possible Anticancer Agent, Type III Interferon, Activates Cell Death Pathways and Produces Antitumor Effects. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011.

TAKAHASHI, H.; OGATA, H.; NISHIGAKI, R.; BROIDE, D.H.; KARIN, M. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta and JNK1-dependent inflammation. **Cancer Cell**, 2010, v, 17, p.89–97.

TARHINI, A.A.; GOGAS, H., KIRKWOOD, J.M. IFN- α in the treatment of melanoma. **Journal of Immunology**, 2012, v. 189, n.8, p.3789-3793.

THAKKAR, J.P.; MCCARTHY, B.J.; VILLANO, J.L. Age-specific cancer incidence rates increase through the oldest age groups. The **American Journal of Medical Sciences**. 2014, v. 348, n.1, p.65-70.

UCSC GENOME BIOINFORMATICS. Disponível em:< <http://genome.ucsc.edu/>>. Acesso em: 04 de nov de 2014.

VÁSQUEZ, C.R.; GÓMEZ, B.P.; DAFNY, N. Interferon Modulates Central Nervous System Function. **Brain Research**, 2012.

WAHAB M, AL-AZZAWI F. Meningioma and hormonal influences. **Climacteric**. 2003;6:285–92.

WITTE, K. et al. Despite IFN-lambda receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines. **Genes and Immunity**, 2009, v. 10,n.8.

WITTE, K. et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2010, v.21, n.4.

WRENCH, et al. Epidemiology of primary brain tumors: Current concepts and review of the Literature. **Neuro-Oncology**, 2002, v. 4, n. 4.

XIE, J.Q. et al. Relationship between the genetic variation in interleukin 28B and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. **Chinese Medical Journal**, 2012, v.125, n.13.

ZHOU, L. et al. Activation of toll-like receptor 3 induces induces interferon lambda expression in human neuronal cells. **Neuroscience**, 2009, v. 159, n. 2.

ZITZMANN, K. et al. Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2006, v. 344, n.4.

Anexos

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 477.105

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a frequência do polimorfismo rs12979860 C/T de pacientes acometidos por Meningiomas; Sequenciar o gene IL28B (IFNL3 Interferon lambda 3), buscando por novos polimorfismos; Sequenciar os sete exons do gene IL28R1, buscando por novos polimorfismos;

Comparar as regiões genômicas obtidas com sequências-referência depositadas no GenBank;

Analisar o perfil de metilação no gene SOCS1; Comparar os dados obtidos com dados clínicos, anatomopatológicos e epidemiológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos aos pacientes são mínimos; a coleta de um fragmento de tumor retirado pela ressecção cirúrgica não adiciona riscos aos pacientes, além dos riscos da cirurgia. A coleta de sangue durante a cirurgia pode causar inchaço e inflamação no local da punção venosa. Os benefícios do estudo são o conhecimento das alterações genéticas e polimorfismos associados ao meningioma, o que pode resultar no desenvolvimento de biomarcadores na doença e ou explicar a suscetibilidade a estes tumores do sistema nervoso central.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante, os métodos de análise de genética, bem como de análise de dados são adequados e a equipe possui experiência na realização das análises propostas.

Serão incluídos um total de 100 pacientes, com amostra de tumor (meningioma) e sangue coletadas de cada paciente. Parte das amostras a serem utilizadas já foi coletada para execução de um projeto de pesquisa anterior, aprovado por este Comitê de Ética (CEP 4328-2012) intitulado Metilação e Expressão do Gene BRCA1 em Meningiomas. Os pacientes foram provenientes do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas de Botucatu e do Hospital Municipal Mário Gatti, Campinas-SP (Aprovado pelo CEP 025/11). Os pesquisadores pretendem continuar a coleta de amostras desses dois hospitais e aumentar a casuística nesse estudo. Além disso, pretendem coletar 10 (dez) amostras de córtex cerebral e de meninges não-tumorais de cadáveres, provenientes do Serviço de Necrópsia do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto consta de todas as autorizações necessárias para a sua execução.

Recomendações:

Não há.

Endereço: Chácara Bulgnoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Telefone: (14)3880-1605

Município: BOTUCATU

CEP: 13.615-970

E-mail: capefup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - UNESP



Continuação do Parecer: 477.105

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram apontadas as seguintes pendências, no parecer anterior:

1. Quantas amostras de pacientes (tumor e sangue) já foram coletadas e quantas serão incluídas prospectivamente. Esclarecer se, nos estudos anteriores, o TCLE especificava que as amostras seriam estocadas para uso em estudos futuros e que os pacientes seriam contatados para fornecer consentimento. A pendência relacionada foi atendida.

2. Revisões a serem realizadas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver comentários e considerações sobre a pesquisa):

a) corrigir linguagem técnica;

b) substituir as frases: "você ou o(a) paciente sob sua responsabilidade", para "você"

c) Substituir a frase: "...continuará sendo assistido (a) e tratado (a) da melhor forma possível, por: a não participação nesse estudo não acarretará qualquer prejuízo a você, sendo que você continuará tendo assistência, acompanhamento e tratamento médico, da mesma forma.

d) Incluir, no TCLE, os telefones de contato do Comitê de Ética em Pesquisa (14) 3880-1608 ou 3880-1609. Separar o TCLE do paciente e do responsável legal pelo paciente; este último pode ser usado caso o paciente não tenha condições de entender e assinar o TCLE. Por não condições de entender ou assinar referimos aos pacientes em estado grave, ou inconscientes que estão impossibilitados de serem consultados quanto a sua participação no estudo.

As pendências relacionadas ao TCLE foram respondidas, sendo que o TCLE foi revisado e encontra-se adequado.

Portanto, pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Bulhões, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Telefone: (14)3880-1608

Município: BOTUCATU

CEP: 13.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa chamada "**Análise da frequência de polimorfismos nos genes *IL28B* e *IL28R1* e do perfil de metilação de *SOCS1* em pacientes acometidos por Meningioma**".

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar possíveis alterações no DNA presentes nas células do sangue e do tumor de pessoas com tumores no cérebro, comparando tais alterações com os dados obtidos em células saudáveis. Os resultados dessa pesquisa poderão contribuir para uma maior compreensão sobre o desenvolvimento e a evolução dos tumores cerebrais, possibilitando o desenvolvimento e melhorias nos cuidados preventivos, métodos mais precisos de detecção precoce e diagnóstico, além de tratamentos mais eficazes.

O objetivo deste folheto é esclarecer aberta e claramente todos os passos envolvidos nessa pesquisa antes de sua decisão quanto à sua participação. A pesquisa está sendo realizada conjuntamente pelos serviços de Neurocirurgia, Patologia e Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, todos vinculados a Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Vale lembrar que você não terá qualquer benefício imediato com esta pesquisa, em princípio, mas poderá contribuir para que sejam melhores entendidas os cânceres que afetam o cérebro. Por outro lado, qualquer informação ou descoberta tida com esta pesquisa, que venha a ser comprovada como benefício, será imediatamente repassada a você ou ao seu médico.

Nenhuma mudança será feita no seu tratamento no que diz respeito ao procedimento cirúrgico ou a qualquer outro tipo de tratamento (radioterapia, quimioterapia, entre outras). Nenhum efeito colateral poderá ser causado pelo presente estudo. A única coisa a ser feita de diferente será: **1)** Coleta de uma amostra de sangue (em torno de 4mL, equivalente a uma colher de sobremesa, igual a que é colhida quando fazemos exame de sangue no laboratório); **2)** Coleta de um pequeno pedaço do tumor que foi retirado durante a cirurgia que você foi submetido.

Observe que estes procedimentos terão baixo risco adicional para você, uma vez que será decorrente do tratamento feito como rotina, realizado por todos os pacientes em semelhante situação. Os materiais serão utilizados para a pesquisa do material genético (DNA) presentes nas células, avaliando a presença ou ausência de alterações.

Todas as amostras ficarão guardadas no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu (UNESP), sob a guarda e responsabilidade da Dra. Maria Inês de Moura CamposPardini. Este material poderá ser utilizado para futuras pesquisas. Se isso for acontecer, você será informado e será solicitada nova

autorização para que o seu material guardado possa ser reutilizado em futuras pesquisas.

Paralelamente, serão anotados alguns dados sobre você, no que diz respeito aos dados pessoais (data de nascimento, documentação, endereço, etc.), histórico da doença, hábitos, antecedentes pessoais e familiares, exames físicos e complementares, laudos histopatológicos e tratamentos realizados. Estas informações serão obtidas através do seu prontuário médico ou, na falta delas, perguntadas diretamente a você. Todos esses dados serão repassados para os pesquisadores através de códigos ao invés de nomes. As informações obtidas neste estudo poderão ser usadas em relatórios, apresentações e publicações, mas o seu nome não será incluído. Todos os dados pessoais serão tratados de maneira confidencial conforme a Legislação vigente.

A sua participação no estudo não acarretará custos e não será disponibilizada nenhuma compensação financeira. Os médicos e pesquisadores envolvidos também não receberão qualquer pagamento para fornecer essas amostras para o estudo.

A duração prevista para o estudo é de 02 (dois) anos, com início em janeiro/2014 e término em janeiro/2016. A qualquer época você poderá ter acesso às informações e conclusões do presente estudo, bem como aos resultados dos exames individualmente.

É importante entender que você não é obrigado (a) a participar da pesquisa. Se você decidir não participar ou desejar suspender sua participação em outro momento, não será necessário dar explicações quanto aos seus motivos. Basta comunicar esta decisão ao seu médico, para que ele tome as devidas providências. A não participação nesse estudo não trará qualquer prejuízo a você, sendo que você continuará tendo assistência, acompanhamento e tratamento médico, da mesma forma. Você também poderá pedir a destruição das amostras coletadas e exames a qualquer momento. Caso o médico assistente resolva alterar seu tratamento, ele poderá realizar a mudança que se fizer necessária sem nenhum prejuízo para a pesquisa.

Se você decidir participar, então leia e assine a DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO E PARTICIPAÇÃO na presença de seu médico. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido original ficará com o médico assistente, que o colocará junto ao seu prontuário. Uma cópia dessa declaração e desse folheto será dada a você. Fique a vontade para fazer perguntas aos pesquisadores, cujos nomes, endereços e telefones encontram-se no final deste documento, mesmo que sua dúvida pareça muito simples. Você poderá também conversar sobre o estudo com familiares, amigos ou com outro (s) médico (s) que lhe acompanha (m).

Você terá mais tempo para pensar se ainda estiver inseguro (a) quanto sua participação nesta pesquisa.

Obrigado por ter lido esse folheto e por considerar sua participação no presente estudo.

DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO E PARTICIPAÇÃO

1. Eu li e entendi todas as informações contidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecidas;
2. Eu tive a oportunidade de conversar o suficiente com o médico assistente e/ou pesquisadores responsáveis sobre as razões deste estudo e sobre seus riscos, esclarecendo todas as minhas dúvidas;
3. Eu compreendi que não haverá custos adicionais para que eu participe desta pesquisa científica;
4. Eu fui informado que não haverá pagamento para qualquer pessoa que participe deste estudo, bem como por produtos ou valores advindos desta pesquisa;
5. Eu fui informado que os meus dados clínicos e os resultados das pesquisas não serão disponibilizados para pessoas que não estejam vinculadas a este estudo ou que não tenham obtido autorização do Comitê de Ética em Pesquisa para tal. Desta forma, dou a permissão para que os pesquisadores tenham total acesso aos meus registros e demais materiais necessários para a configuração do referido estudo.
6. Eu estou ciente de que, quando for preciso esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre qualquer fato ocorrido durante minha participação neste projeto, poderei procurar o (s) Pesquisador (es) Responsável (is) pela pesquisa científica;
7. Sei que a qualquer momento e por qualquer motivo poderei retirar esta autorização, sem que isso acarrete alteração ou prejuízo ao meu atendimento médico e à atenção que eu tenho direito;
8. Confirmando que aceito de livre e espontânea vontade que minha amostra faça parte desta pesquisa científica, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa;
9. Eu recebi uma cópia completa deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nome Completo
(paciente): _____

RG: _____

CPF: _____

Data de Nascimento: __/__/____

Prontuário N°.: _____

Sexo: () Feminino () Masculino

Telefone: () _____

Endereço: _____ N°.: ____

Compl.: _____

Bairro : _____

Cidade: _____ Estado: ____

Assinatura: _____.

Nome Completo do Responsável
legal: _____

RG: _____

CPF: _____

Data de Nascimento: __/__/____

Telefone: () _____

Endereço: _____ N°.: ____.

Compl.: _____

Bairro : _____

Cidade: _____ Estado: ____

Grau de Parentesco com o (a) Paciente: _____

Assinatura Assinatura: _____.

**DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA
PELO MÉDICO RESPONSÁVEL**

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o paciente participante e/ou seu responsável, explicando todas as informações apresentadas neste termo e incentivado perguntas sobre o referido estudo.

Nome Completo: _____

RG: _____

CPF: _____

Função: _____

Inscrição no Conselho Profissional: _____

Local e Data: _____, ____ de _____ de 20__.

Assinatura: _____.

COLABORADORES:

Dra. ADRIANA CAMARGO FERRASI

Endereço: R. Caetes, 2-50, Vila Antártica, Bauru-SP. Telefone: (14) 3232 2705.

Dra. SÍLVIA HELENA BAREM RABENHORST

Endereço: Rua Marcos Macedo 1301, apto 802, Aldeota, Fortaleza-CE. Telefone: (85) 9994 5689.

Dr. MÁRIO HENRIQUE GIRÃO FARIA

Endereço: Avenida das Amoreiras, 407, Parque Itália, Campinas-SP. Telefone: (19) 981315599.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA: Endereço: Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Medicina Rubião Junior s/nº - Botucatu- SP. Telefone: (14) 3880-1608/ (14) 3880-1609.