

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Aline Aparecida Del Vescovo

Estudo das alterações genéticas da Interleucina 28B em
Astrocitomas

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu
2016

Estudo das alterações genéticas da Interleucina 28B em Astrocitomas

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Botucatu
2016

Aline Aparecida Del Vescovo

Estudo das alterações genéticas da Interleucina 28B em Astrocitomas

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi

Orientadora

Departamento de Clínica Médica
FMB/ UNESP - Botucatu - SP.

Profa. Dra. Marco Antonio Zanini

Membro

Departamento de Clínica Médica
FMB/ UNESP - Botucatu - SP.

Profa. Dra. Teresa Cristina de Barros

Membro

Universidade Paulista – Bauru.

Botucatu, 22 de fevereiro de 2016

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

Del Vescovo, Aline Aparecida.

Estudo das alterações genéticas da Interleucina 28B em
Astrocitomas / Aline Aparecida Del Vescovo. - Botucatu,
2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Adriana Camargo Ferrasi

Capes: 20205007

1. Interleucinas. 2. Mutação. 3. Polimorfismo
(Genética). 4. Variação (Biologia). 5. Genes. 6.
Astrocitoma.

Palavras-chave: IL28B; Mutação; Polimorfismo.

Epigrafe

‘Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.’

Charles Chaplin

Agradecimientos

Ao Senhor da vida, Javé, obrigada pelas graças que me destes, oportunidades que nem sei se sou merecedora. Pela coragem de lutar todos os dias pelos meus sonhos.

Aos meus pais, heróis, que no desafio diário nunca hesitou esforços para me fazer uma mulher de bem. Que sempre me deram seu melhor, o amor.

Ao meu irmão que na sua simplicidade é um grande homem, e que me ensina com seu jeito de ser, a levar a vida de um jeito mais leve...pelas risadas, conselhos e todo carinho que tem por mim.

A minha orientadora, Adriana Camargo Ferrasi, por me dar a oportunidade de realizar um sonho, dedicando seu tempo a me ensinar. Pessoa generosa que não mede esforços para ajudar. Obrigada pelos ensinamentos e pelas caronas.

A Dra Maria Inês, por abrir as portas de seu Laboratório, e permitir o aprimoramento das minhas habilidades, sempre muito receptiva.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Aline Galvani e Renata que me ajudaram muito, mas muito mesmo, no desenvolvimento do trabalho. Além da amizade e carinho que tenho por vocês aprendi a admirar as grandes profissionais que vocês são.

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

Aos pacientes, muito solidários, que mesmo sofrendo com suas enfermidades aceitaram participar deste projeto em prol de ajudar a ciência para possivelmente no futuro ajudar outras pessoas.

Enfim, entre outras pessoas que aqui não estão citadas, mas que muito contribuíram para a realização deste projeto, dedico minha profunda gratidão.

Resumo

RESUMO

VESCOVO, A.A.D. Estudo das alterações genéticas da Interleucina 28B em Astrocitomas. Botucatu, 2015. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Os Astrocitomas são tumores de Sistema Nervoso Central (SNC) caracterizado, quanto à sua nomenclatura e grau de malignidade, conforme seu tipo histológico e seu potencial proliferativo, presença de necrose e invasão cortical. 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* em pacientes acometidos por Astrocitomas. Cinquenta e sete pacientes tratados pelo serviço de Neurocirurgia da UNESP de Botucatu/SP foram incluídos neste estudo. A análise do polimorfismo *rs12979860 C/T* não 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*) no gene *IL28B* ao comparar com a sequência referência disponível 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 astrocitomas devem ser considerado.

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

Abstract

ABSTRACT

VESCOVO, A.A.D. **Study of genetic changes of Interleukin 28B in astrocytomas**. Botucatu, 2015. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, *campus* of Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The astrocytomas are tumors of the central nervous system (CNS) characterized as to its nomenclature and degree of malignancy, according to their histological type and their proliferative potential, presence of necrosis and cortical invasion. Interferons (IFNs) were originally associated with the antiviral response, however, subsequent studies revealed the involvement of these cytokines in the regulation of cell growth and immunomodulatory effect. Interleukin 28B (IL28B), member of the family of IFNs type III appears to be involved in the antiviral and anti-tumor immune response. Thus, the aim of this study was to evaluate the frequency of genetic variation in IL28B in patients suffering from astrocytomas. Fifty-seven patients treated by our service at UNESP in Botucatu / SP were included in this study. Rs12979860 C / T polymorphism analysis was not statistically significant when compared to genotypic frequency of the population in relation to this study. It described the detection of new genetic variants (missense and silent) in IL28B gene to compare with the reference sequence available in the database (NCBI). These data suggest an important relationship between these genetic variations regarding the structure and function of the proteins involved, however further study of the consequences of these changes in the genesis and / or progression of astrocytomas should be considered.

Keywords: *IL28B*; Mutation; Polymorphism

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias cerebrais são classificadas baseando-se no tipo histológico do tumor primário e o grau de malignidade. Estes tumores acometem indivíduos de todas as idades, e vem aumentando sobretudo nos idosos, autores sugerem que este aumento deve-se às melhorias nas técnicas diagnósticas, cada vez mais sensíveis e menos invasivas, como a ressonância magnética e a tomografia computadorizada (INCA, 2012).

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).

Os Gliomas são neoplasias originárias das células da glia encefálica, cuja principal função é dar suporte nutricional, sanguíneo, estrutural e de defesa aos neurônios. Quatro tipos celulares formam a glia: os astrócitos, os oligodendrócitos, a micróglia e epêndima. Assim, os gliomas podem ser divididos em quatro grandes grupos, segundo o tipo celular que o originou: astrocitomas, oligodendroglioma, ependimomas e os oligoastrocitomas (gliomas mistos). Dentre os gliomas, 70% são astrocitomas, 10-15 % são oligodendrogliomas e três-cinco por cento são do tipo ependimomas.

Os tumores astrocíticos são derivados das principais células de sustentação da glia, os astrócitos. Classicamente, os astrocitomas são divididos de acordo com o grau de malignidade:

- **GRAU I: astrocitomas pilocíticos** – com incidência estimada em menos de um caso/100.000 pessoas/ano, principalmente casos pediátricos. Histologicamente se apresentam como neoplasias de celularidade baixa a moderada, constituídas por astrócitos. A cirurgia é o tratamento de escolha para tais lesões, sendo curativa na maioria dos casos. Entretanto em alguns casos a quimioterapia tem sido utilizada, principalmente em crianças com tumores nas vias ópticas (PACKER *et al.*, 1997).

- **GRAU II: astrocitomas difusos fibrilares** - são menos frequentes em crianças, afetando mais comumente jovens adultos. Ao exame histopatológico, estes tumores apresentam maior celularidade, são mais infiltrativos e tendem a sofrer transformação anaplásica de modo mais frequente.
- **GRAU III: astrocitomas anaplásicos** - são neoplasias infiltrativas, com um alto potencial proliferativo, afetando principalmente adultos. Esses tumores estão associados à menor sobrevida quando comparados com os dois anteriores, chegando a uma média de 3 a 4 anos em 70% dos casos. A cirurgia continua sendo a melhor opção de tratamento e esta deve ser a mais ampla possível.
- **GRAU IV: glioblastomas multifatoriais** - mais comumente chamado de glioblastoma multiforme, é o tipo de tumor cerebral mais frequente em adultos e o tumor mais agressivo desta linhagem, correspondendo a aproximadamente 50% dos tumores malignos do SNC. São clinicamente agressivos e extremamente invasivos, com capacidade de invasão extra-axial. Essa neoplasia se apresenta frequentemente na idade adulta, após os 40 anos de idade, mas não são exclusivos desta idade.

O Astrocitoma se apresenta com uma maior frequência no sexo masculino, em caucasianos, entre os 30 e 50 anos de idade. O tratamento cirúrgico pretende melhorar a qualidade e aumentar o tempo de sobrevida do paciente, dependendo ainda do grau de malignidade do tumor (I a IV). Os tumores encefálicos primários mais frequentes nos adultos são os Astrocitomas Anaplásicos e os Glioblastomas Multiformes, e eles apresentam maior morbidade e mortalidade na prática neurológica (OHAEGBULA *et al.*, 1980).

Alguns estudos (PIEMONT; ZERBI; DI CARLO, 2003) mostraram 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. Até o momento pouco se sabe sobre as vias que levam à carcinogênese e progressão dos tumores gliais.

O Sistema Imunológico é responsável por destruir agentes estranhos ao organismo, denominados antígenos. As células possuem naturalmente uma tendência de exibirem transformações malignas, estas alterações podem ser provocadas por modificações no DNA (inserção e/ou deleção de nucleotídeos; recombinação gênica e rearranjos cromossômicos) que levam a alterações na proteína final, que conferem imortalidade e transformação na célula. Assim, ao longo desta transformação, uma célula normal pode vir a expressar proteínas em níveis anormais ou mesmo novas proteínas que não haviam sido expressas anteriormente, perdendo o controle dos processos vitais (COUSSENS e WERB 2002).

A célula neoplásica apresenta diversos mecanismos para escape da vigilância imunológica. Em contrapartida, um sistema imune competente apresenta um papel de vigilância eficiente o que faz com que iniba ou retarde o desenvolvimento do tumor. Com isso, o Sistema Imune está intimamente correlacionado com o desenvolvimento de Tumores (ABBAS, *et al.* 2000).

As citocinas são produtos proteicos secretados geralmente por células do Sistema Imune, estas possuem atividades diversificadas, como mediação de respostas imunes e inflamatórias, atuação sobre vários tipos de células, atuação sobre processos de síntese de RNA mensageiro (RNAm), entre outros. Elas incluem os interferons e as interleucinas (IL). Algumas ILs são produzidas por várias células não leucocitárias. As atividades das ILs podem ser: reconhecimento de antígenos estranhos por células T, amplificação da proliferação de células T ativadas, entre outras funções, com atuação em células alvo e efeitos específicos sobre cada alvo (ABBAS, *et al.* 2000).

Por meio da produção de citocinas, os Linfócitos T CD4⁺ possuem um papel fundamental na sustentação da expansão clonal linfocitária e na geração de uma resposta inflamatória. A ativação destes linfócitos acontece por meio do reconhecimento de antígenos associados a moléculas de MHC (Complexo Maior de Histocompatibilidade) de classe II na superfície de fagócitos. Estes antígenos são produtos da endocitose de células tumorais e do processamento de seus

peptídeos no citoplasma de células apresentadoras. Após a ativação, os linfócitos CD4⁺ (*cluster of differentiation*) produzem altos níveis de IL-2, (Interleucina) que é um fator de crescimento e proliferação linfocitária, tanto para linfócitos T CD4⁺ como para linfócitos CD8⁺. Além de IL-2, estes produtos produzem altos níveis de IL-4, IL-5, IL-6, entre outras citocinas. A partir da produção destas citocinas, os linfócitos T CD4⁺ estabelecem uma intercomunicação entre a resposta imune inata e a adaptativa, que é extrema importância para uma resposta antitumoral eficiente. (NISHIMURA *et al.*, 2005).

Os interferons são glicoproteínas pertencente à família das citocinas, classificados em três grupos diferentes: Tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ e IFN- ω); Tipo II (IFN- γ) e Tipo III (IFN- λ) os quais interagem via receptores celulares específicos, controlando a homeostasia do organismo (VÁZQUEZ; GÓMES; DAFNY, 2012). Eles possuem atividade antiproliferativa com ação antagônica a maioria dos fatores de crescimento. Atuando na imunomodulação sobre vários elementos do sistema imune, tais como estimulação das atividades líticas das células *natural killer* (NK), linfócitos T citotóxicos e macrófagos sobre as células tumorais, modificação da produção de anticorpos pelas células B e regulação da expressão de antígenos via MHC classe I na membrana celular (PIEMONT; ZERBI; DI CARLO, 2003; WITTE *et al.*, 2010).

Interferon lambda (INF- λ) são citocinas que possuem forma de pequenas hélices frequentemente associadas a respostas antivirais. O genoma humano contém três subtipos de INF- λ ; INF- λ 1 (IL-29), INF- λ 2 (IL-28A) e INF- λ 3 (IL-28B) codificada por três diferentes genes localizados no *locus* 19q13 e possui seis *exons* (SHEPPARD *et al.*, 2004; KOTENKO *et al.*, 2003). Neste estudo foi realizada a padronização do termo IL28B para se referir ao INF- λ 3.

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). Seu receptor é composto por INF- λ R1 e compartilha o receptor com IL-10R2, deste modo existe alta afinidade com IL-10, a ativação deste complexo receptor por INF- λ induz a transcrição de vários outros genes. Entretanto, somente um limitado grupo de células e tecidos responde aos INF- λ , enquanto

que quase todos os tipos celulares respondem a IL-10 (ONOGUCHI *et al.*, 2007). O INF- λ parece ter um papel fundamental nas respostas imunes antivirais e antitumorais (KOTENKO *et al.*, 2003).

Inicialmente, os IFNs foram associados à resposta antiviral e estudos posteriores evidenciaram o seu envolvimento na regulação do crescimento celular e no efeito imunomodulatório (STARK *et al.*, 1998; GOODBOURN *et al.*, 2000). O conhecimento sobre o INF- λ é ainda crescente e estudos apontam um substancial potencial terapêutico (ONOGUCHI *et al.*, 2007).

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). Entretanto, os efeitos colaterais do tratamento são tóxicos e severos, o que torna difícil a sua continuidade (FUNG; LOK, 2004; PESTKA, 2004).

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, estudos estão sendo dirigidos para investigar o potencial antitumoral dos IFN-III (STEEN; GAMERO, 2010), principalmente devido à menor toxicidade desta citocina (MILLER *et al.*, 2009). Resultados encorajadores tem sido apresentados para certos tipos de tumores como os 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 INF- λ na inibição da proliferação celular na linhagem de células tumorais LN319 de glioblastoma (MEAGER *et al.*, 2005).

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) sendo assim, os efeitos tóxicos são menos severos quando comparados ao receptor para IFN- α (complexo IFNAR1 e IFNAR2) que é expresso pela maior parte das células.

O trato gastrointestinal, respiratório, coração, diversas glândulas, baço, timo, medula óssea 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 transmembranas, 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.*, 2004; 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 (INF), moléculas pró-apoptóticas. (ZITZMANN *et al.*, 2006).

Estudos recentes indicaram que a presença de um SNP (Single nucleotide polymorphism) localizado na região que antecede o promotor da transcrição do gene *IL28B* (rs12979860 C/T) está associado a melhor resposta antiviral sustentada pós tratamento da Hepatite C pelo IFN- α peguillado associado com ribavirina (RAUCH *et al.*, 2010). Ainda, indivíduos com o genótipo CC apresentaram maiores chances de depuração espontânea viral (80%), quando comparados àqueles com genótipo TT (25%) e CT (razão intermediária) (FABRIS *et al.*, 2011; BIBERT *et al.*, 2013). O alelo T parece estar associado com a redução 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.

Nesse contexto, visto que já foi estabelecida a influência da citocina IL28B na resposta imune antiviral e antitumoral e também, que estas compartilham vias moleculares, o presente estudo tem como objetivos investigar a ocorrência de variações genéticas no gene *IL28B* e a frequência do polimorfismo rs12979860 C/T em pacientes acometidos por Astrocitomas, conduzindo à aquisição de novos conhecimentos para o entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese e/ou progressão dessa neoplasia.

Objetivo

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Analisar a ocorrência de alterações genéticas no IL28B e determinar a frequência do polimorfismo rs12979860 C/T em pacientes acometidos por astrocitomas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a frequência do polimorfismo rs12979860 C/T em pacientes acometidos por astrocitomas;
- Sequenciar o gene *IL28B* (*IFNL3* interferon, *lambda* 3), buscando por novas variações genéticas;
- Comparar os resultados obtidos com sequências-referência depositadas no Gene Bank.
- Comparar os dados obtidos com dados clínicos e anatomopatológicos.

Casistica 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 097423/2014.

b) Casuística

Pacientes acometidos por astrocitomas operados de acordo com a rotina de atendimento do Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP foram convidados a participar deste estudo, totalizando 57 casos.

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

c) Critérios de inclusão

I- Presença ou suspeição de astrocitomas 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).

d) 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

Uma alíquota contendo aproximadamente 4mL de sangue total foi coletada durante o procedimento cirúrgico, em tubo contendo anticoagulante (EDTA), para ser separada em Sangue Total e posteriormente processada (centrifugação por 15 minutos à 2.500rpm) para separação de Plasma e células brancas (*Buffy Coat*).

As amostras coletadas e processadas foram identificadas através de códigos e, posteriormente, foram armazenadas em freezer à -80°C, no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu (UNESP)- Divisão Hemocentro.

b) Extração de ácidos nucleicos (DNA)

Foi realizada a extração de DNA de sangue total utilizando o kit *Axy Prep Blood Genomic DNA mini prep Kit* (Axy gen Biosciences) segundo as especificações do fabricante. A concentração dos ácidos nucleicos, após a extração, foi determinada em espectrofotômetro (*Nano Drop ND-1000*) e cada amostra será avaliada quanto a sua pureza pela razão de absorbância A260/A280nm.

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.

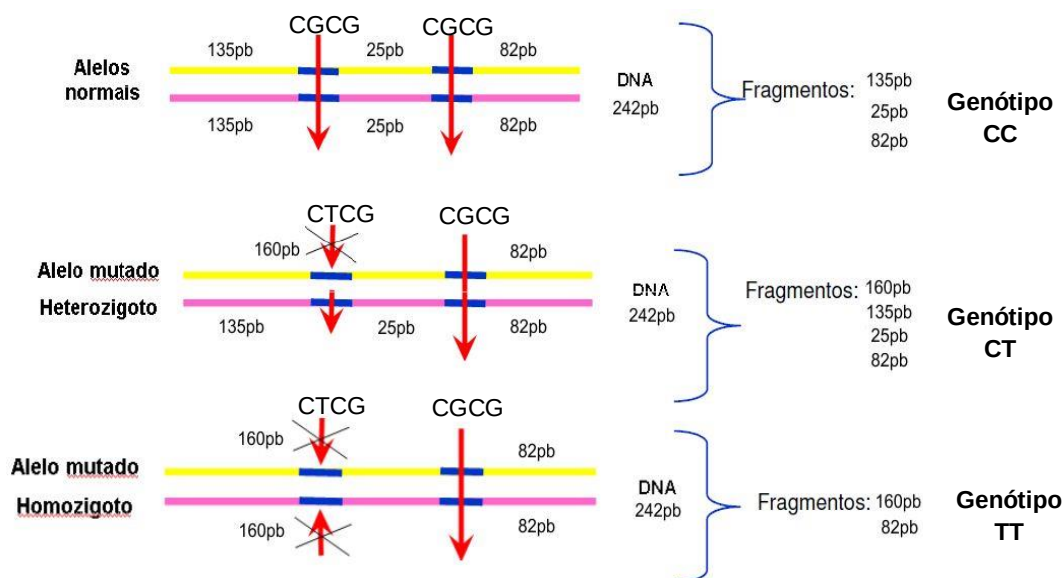


Figura 1. Esquema ilustrativo dos perfis genotípicos para o polimorfismo rs12979860 do gene da *IL28B*, evidenciando os genótipos CC, CT e TT.

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).

a) 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.

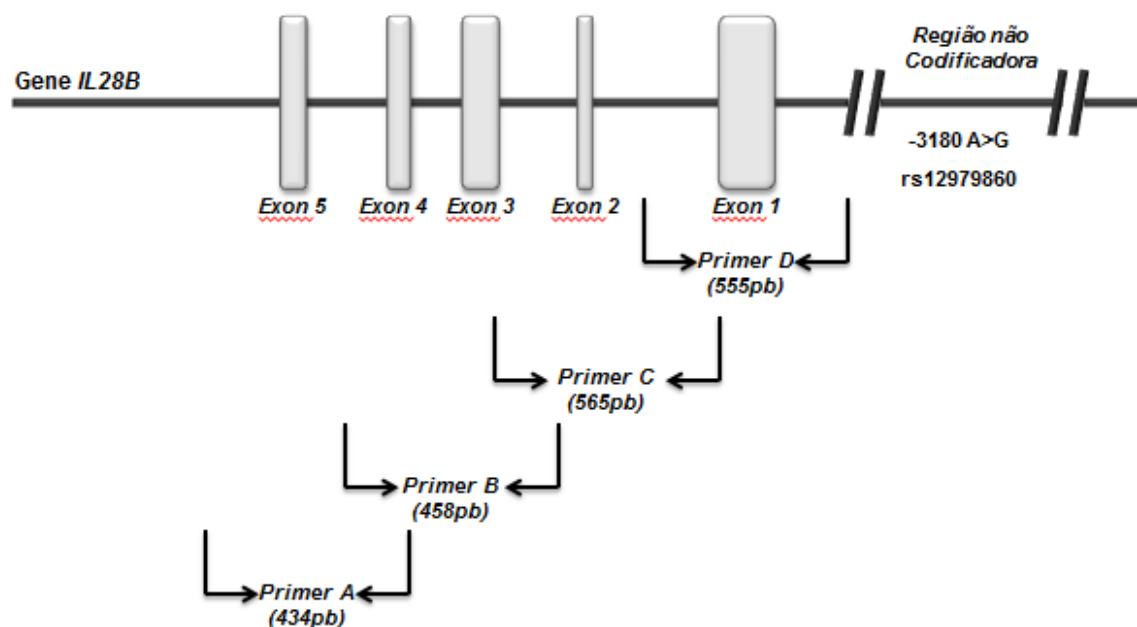


Figura 2. Representação esquemática das regiões de anelamento dos *primers* e seus produtos de amplificação em pares de bases (pb). Para amplificação completa do gene da *IL28B* foram desenhados quatro pares de *primers*, cujos produtos juntos e sobrepostos em suas extremidades, representam o gene inteiro.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

a) Purificação dos produtos de PCR de *IL28B*

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*

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*

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*

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 até o momento do sequenciamento.

d) Sequenciamento de *IL28B*

A determinação da sequência de nucleotídeos dos fragmentos A,B, 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*

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).

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.

Resultados

4. Resultados

4.1 Caracterização da Casuística

A casuística foi composta por 57 amostras de astrocitomas, coletadas no Serviço de Neurocirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Dentre estas, 52,6% foram do sexo feminino e 47,4% do sexo masculino. As medianas das idades foram associadas de acordo com o sexo e Grau de malignidade dos tumores, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos pacientes acometidos por astrocitoma distribuídos por grau tumoral.

Gênero		Grau*	Mediana Idade
Feminino 30 (52,6%)	Grau I	4 (13,3%)	16 (08-27)
	Grau II	5 (16,7%)	22 (03-40)
	Grau III	7 (23,3%)	31 (23-74)
	Grau IV	14 (46,7%)	54 (20-86)
Masculino 27 (47,4%)	Grau I	1 (3,7%)	13 (13)
	Grau II	1 (3,7%)	56 (56)
	Grau III	5 (18,5%)	44 (35-56)
	Grau IV	20 (74,1%)	56 (04-82)

* Teste Exato de Fisher; $p = 0,1262$

Na presente casuística, os indivíduos mais velhos foram acometidos por graus de malignidade tumoral mais avançado (grau III e IV) quando comparados aos mais jovens, em ambos os sexos.

Quando os casos foram agrupados segundo o grau tumoral, foi observado que 96,3% dos homens e 70% das mulheres apresentaram tumores mais agressivos (III e IV).

4.2 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).

As frequências alélicas e genóticas distribuídas entre os sexos são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo *rs12979860* do gene da *IL28B*, distribuídas por sexo.

	Total (n=57)	Feminino (n=30)	Masculino (n=27)	<i>P-value*</i>
Genótipos	Frequência Genotípica			
CC	21 (36,8%)	08 (26,7%)	13 (48,1%)	0.2030
CT	29 (50,9%)	17 (56,7%)	12 (44,4%)	
TT	07 (12,3%)	05 (16,6%)	02 (7,5%)	
Alelos	Frequência Alélica			
C	71 (62,3%)	33 (55%)	38 (70,4%)	0.1216
T	43 (37,7%)	27 (45%)	16 (29,6%)	

n= número de casos analisados.

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

Os genótipos homozigotos CC e TT foram observados em 36,8% e 12,3% dos pacientes, respectivamente e os heterozigotos representaram 50,9% dessa casuística. Não houve diferença estatística quando foi comparado os genótipos pelo sexo, sugerindo que não há interferência do sexo na presença do polimorfismo.

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 3 apresenta as frequências genotípica e alélica do polimorfismo nessas populações.

Tabela 3. 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 astrocitomas 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 é apresentada na tabela 4.

Tabela 4. Análise da frequência genotípica e alélica dos casos de astrocitomas e dos indivíduos sadios (brasileiros e do banco de dados *dbSNP*).

	Astrocitoma	Brasil*	dbSNP**	P-value***
Genótipos				
CC	36,8%	43,8 a 52%	ND*	0.3114
CT	50,9%	40 a 43,7%	ND*	
TT	12,3%	8 a 14,6%	ND*	
Alelos				
C	62,3%	64 a 72%	64%	0.4587
T	37,7%	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

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências genotípica e alélica dos grupos caso (astrocitoma) e controle (sadios), contudo, a frequência dos heterozigotos foi discretamente mais elevada nos pacientes acometidos por astrocitoma e o mesmo foi observado para o alelo T.

As frequências genotípica e alélica de *rs12979860* foram determinadas para os graus tumorais e esses dados são apresentados na tabela 6.

	GRAU				<i>P-value*</i>
	I	II	III	IV	
Genótipos					
CC	40%	50%	25%	38,2%	0.0001
CT	40%	25%	58,3%	53%	
TT	20%	25%	16,7%	8,8%	
Alelos					
C	60%	62,5%	54,2%	64,7%	0.4396
T	40%	37,5%	45,8%	35,3%	

Pode-se verificar que o genótipo CC é mais frequente nos tumores de grau I e II (menos agressivos), e nos tumores mais agressivos predominou o genótipo

heterozigoto. Entretanto, a análise dos alelos nos mostra que não há diferença estatística entre os graus do astrocitoma.

Sequenciamento do gene *IL28B*

Para a detecção de possíveis variações genéticas em *IL28B* foi realizado o sequenciamento automático de toda a sua extensão em 30 casos de Astrocitomas, selecionados de forma aleatória.

A figura 3 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.

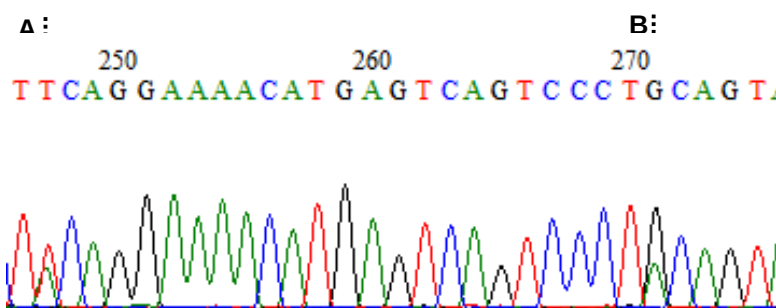


Figura 3. Eletroferograma ilustrativo da sequência parcial de nucleotídeos do gene *IL28B*. A sequência exibe variação genética em heterozigose (T/C) e (G/A), evidenciada pela sobreposição dos picos na mesma posição nucleotídica, indicadas pelas setas A e B respectivamente.

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 foram observadas em toda a sua extensão, tanto nas regiões codificantes (exons 1, 2, 3, 4 e 5) como nas não codificantes (introns 1, 2, 3 e 4) (Tabela 6).

Tabela 6. Análise das variações genéticas germinativas observadas no gene *IL28B* em pacientes acometidos por astrocitoma.

Região Gênica	Variação	Posição Genoma	Código Genético	Aminoácido	Mutação	RNAm	Proteína	Frequência Absoluta	Observação	Significância Fenotípica
5' UTR	G>C	G3C	CTG>CTC	-	-	-	-	20 hom/10 het	ND*	ND*
	T>C	T7C	TCC>CCC	-	-	-	-	29 het	ND*	ND*
EXON 1	C>T	C45T	ACC>ACT	Thr>Thr	<i>Silent</i>	C6T	T2T	1 hom/29 het	rs630388	ND*
	T>C	T56C	ATG>ACG	Met>Thr	<i>missense</i>	T17C	M6T	5 hom/25 het	rs71356848	ND*
	G>A	G122A	CGC>CAC	Arg>His	<i>missense</i>	G83A	R28H	1 hom/29 het	rs629976	ND*
INTRON 1	G>C	G273C	-	-	-	-	-	2 het	ND*	ND*
	T>C	T308C	-	-	-	-	-	2 het	ND*	ND*
	C>T	C351T	-	-	-	-	-	3 het	ND*	ND*
	C>T	C357T	-	-	-	-	-	7 het	ND*	ND*
	A>T	A381T	-	-	-	-	-	4 het	ND*	ND*
	T>C	T454C	-	-	-	-	-	4 het	ND*	ND*
	A>G	A458G	-	-	-	-	-	5 het	ND*	ND*
	G>A	G459A	-	-	-	-	-	5 het	ND*	ND*
EXON 2	A>G	A541G	AAG>AGG	Lys>Arg	<i>missense</i>	A209G	K70R	2 hom/17 het	rs8103142	ND*
	G>A	G547A	CGC>CAC	Arg>His	<i>missense</i>	G215A	R72H	5 het	rs201418207	**S
INTRON 2	C>T	C661T	-	-	-	-	-	30 het	ND*	ND*
	T>G	T663G	-	-	-	-	-	29 het	ND*	ND*
	C>T	C668T	-	-	-	-	-	28 het	ND*	ND*
	A>C	A675C	-	-	-	-	-	12 hom/18 het	ND*	ND*
	C>T	C681T	-	-	-	-	-	25 het	ND*	ND*
	C>T	C689T	-	-	-	-	-	25 het	ND*	ND*
	C>T	C695T	-	-	-	-	-	28 het	ND*	ND*
	A>C	A706C	-	-	-	-	-	8 hom/22het	ND*	ND*
	C>T	C707T	-	-	-	-	-	29 het	ND*	ND*
	T>C	T718C	-	-	-	-	-	28 het	ND*	ND*
	G>A	G719A	-	-	-	-	-	30 het	ND*	ND*

	T>C	T724C	-	-	-	-	-	20 hom/10 het	ND*	ND*
	C>T	C760T	-	-	-	-	-	30 het	ND*	ND*
	C>A	C797A	-	-	-	-	-	6 hom/22 het	ND*	ND*
	A>C	A798C	-	-	-	-	-	1 hom/28 het	ND*	ND*
	A>C	A799C	-	-	-	-	-	29 hom/1 het	rs11881222	ND*
	C>T	C780T	-	-	-	-	-	30 het	ND*	ND*
	C>T	C781T	-	-	-	-	-	9 hom /21 het	ND*	ND*
	T>G	T782G	-	-	-	-	-	22 hom/6 het	ND*	ND*
	T>C	T785C	-	-	-	-	-	1hom/21 het	ND*	ND*
	T>C	T815C	-	-	-	-	-	30 hom	ND*	
	C>G	C816G	-	-	-	-	-	3 hom/17 het	ND*	ND*
	C>T	C835T	-	-	-	-	-	30 het	ND*	ND*
EXON 3	G>T	G850T	GTG>TTG	Val>Leu	missense	G259U	V87L	25 het	ND*	ND*
	T>G	T851G	GTG>GGG	Val>Gly	missense	U260G	V87G	29 het	ND*	ND*
	G>A	G856A	GAG>AAG	Glu>Lys	missense	G265A	E89K	2 het	ND*	ND*
	A>G	A857G	GAG>GGG	Glu>Gly	missense	A266G	E89G	28 het	ND*	ND*
	G>C	G858C	GAG>GAC	Glu>Asp	missense	G267C	E89D	2 het	ND*	ND*
	C>G	C859G	CGC>GGC	Arg>Gly	missense	C268G	R90G	2 hom/28 het	ND*	ND*
	C>T	C864T	CCC>CCG	Pro>Pro	Silent	C273U	P91P	30 het	ND*	ND*
	T>G	T866G	GTG>GGG	Val>Gly	missense	U275G	V92G	6 hom/21 het	ND*	ND*
INTRON 3	G>T	G1058T	-	-	-	-	-	1 het	rs188088762	ND*
EXON 4	C>T	C1157T	CAC>TAC	His>Tyr	missense	C466T	H156Y	2 het	rs139076671	ND*
EXON 5	G>A	G1295A	GAG>AAG	Glu>Lys	missense	G511A	E171K	1 hom/1 het	ND**	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 41 novas variações e 8 anteriormente descritas.

Nas regiões não codificantes (5'UTR e *introns*) foram constatadas um total de 34 variações. Já nos *exons* foram encontradas 15 variações (destas, três no *exon* 1, duas no *exon* 2, oito no *exon* 3, uma no *exon* 4 e uma no *exon* 5).

Em uma análise global (variações descritas e inéditas), 86,7% das variações são do tipo *missense* na sequência primária proteica.

Em todas as amostras analisadas (30/30) foi observada uma mutação de ponto do *exon* 1 (posição genômica T56C - troca de uma timina por uma citosina no 56º nucleotídeo desse gene), 5 em homozigose e 25 em heterozigose; tal mutação provoca a troca do aminoácido metionina (Grupo R neutro, apolar, hidrofóbico) por um treonina (Grupo R neutro, polar, hidrofílico) na cadeia polipeptídica da IL28B.

O *exon* 1 também apresentou variação na posição G122A em todos os casos, produzindo uma troca *missense* de Arginina por Histidina (ambas com Grupo R carregado positivamente, grupamento básico); somente em um dos casos a alteração estava em homozigose.

No *exon* 2, a variação em A541G resulta em troca da lisina por arginina (ambas de Grupo R carregado positivamente, grupamento básico) na cadeia polipeptídica. Outra variação que ocorreu neste *exon* foi em G547A, o que ocasiona a troca de uma arginina por uma histidina (ambos com Grupo R carregado positivamente, grupamento básico), este polimorfismo já foi descrito anteriormente e parece induzir a redução da atividade da citocina na resposta imunológica antiviral (GAD et al., 2009).

No *exon* 3, uma das alterações mais relevantes foi a G850T que provoca a troca de uma valina por leucina (ambos Grupo R neutro, apolar, hidrofóbicos) em 25 indivíduos heterozigotos. Também, a variação na posição T851G substitui valina por glicina (ambos Grupo R neutro, apolar, hidrofóbicos); em A857G observa-se a troca de um ácido glutâmico (Grupo R carregado negativamente, grupamento ácido) por uma glicina (Grupo R neutro, apolar, hidrofóbico) em 28 casos heterozigóticos.

Ainda no *exon* 3, foi observado em 100% dos casos a variação na posição C859G que provoca a troca do aminoácido arginina (Grupo R carregado positivamente, grupamento básico) pelo glicina (Grupo R neutro, apolar, hidrofóbico) e outra alteração neste *exon* ocorreu na posição T866G (valina por glicina; grupo R neutro, apolar, hidrofóbico).

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 a variação R72H (marcada por elipse vermelha), descritas na figura 4.

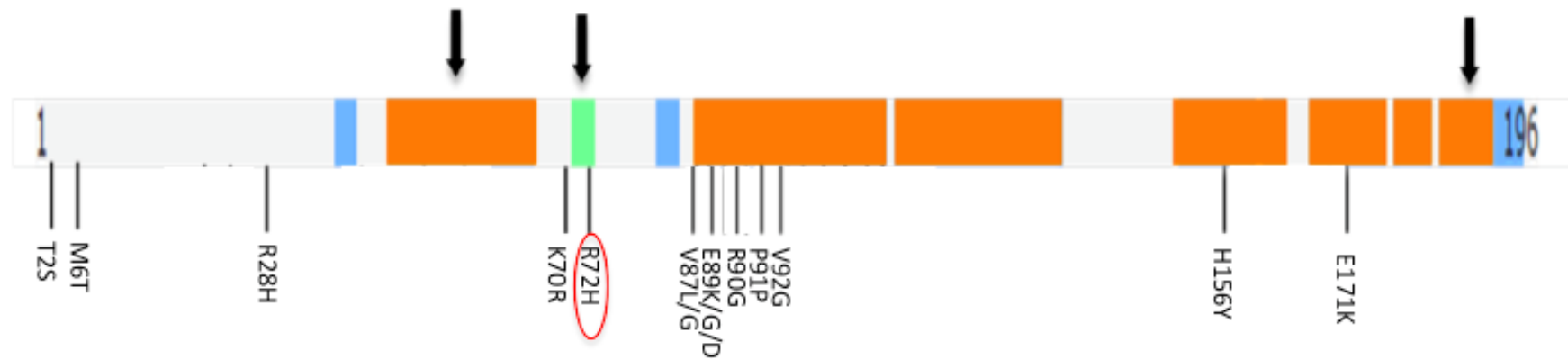


Figura 4: Ilustração da distribuição das mutações *missense* ao longo da estrutura primária da IL28B detectadas em pacientes acometidos por astrocitoma. Legenda: Retângulos azuis e laranjas simbolizam as hélices e alfa-hélices, respectivamente e os retângulos verdes representam as cadeias beta na estrutura 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/>

Discussão

4. DISCUSSÃO

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.

Após a descoberta da família interferon-lambda (IFN- λ), tem aumentado o interesse por compreender o papel desempenhado por essas citocinas (IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3), não apenas na resposta a infecções virais, mas também ao câncer. O gene *IFN- λ 3*, mais conhecido como *IL28B*, tem se mostrado importante em ambas as respostas imunes, mas, principalmente na resposta antiviral. O polimorfismo *rs12979860* (C/T) localizado na região não codificante 5'UTR do *IL28B* tem sido fortemente associado a uma melhor resposta ao tratamento da hepatite C baseada em interferon peguilado associado a ribavirina e também ao clareamento espontâneo (THOMAS, 2009; FABRIS, et al., 2011; BIBERT, et al., 2013).

A resposta imune antiviral e antitumoral compartilham algumas vias e mecanismos, contudo, são escassos os estudos sobre a relevância do polimorfismo *rs12979860* (C/T) da *IL28B* na resposta aos tumores.

Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivos analisar a frequência do polimorfismo *rs12979860* (C/T) e verificar a ocorrência de variações genéticas no gene *IL28B* em pacientes acometidos por astrocitomas.

Não foi observada associação das frequências genotípica e alélica com a ocorrência de astrocitoma, embora tenha sido verificado que o genótipo CT foi discretamente mais elevado nos pacientes do que no grupo controle (sadios/doadores de sangue) e o mesmo foi observado para o alelo T. Estudos mostraram que a presença do alelo T (variante) reduz o nível de expressão da *IL28B*, quando comparado ao alelo ancestral C (XIE et al., 2012; BELLANTI et al., 2012).

Embora as frequências dos alelos C e T do polimorfismo rs12979860 sejam similares nos astrocitomas estudados e na população sem tumor, a investigação da estrutura primária da proteína sintetizada seria de grande interesse, uma vez que, não basta a sua produção, mas que seja garantida a sua estrutura molecular e função biológica. Baseados nessa hipótese, o gene *IL28B* foi sequenciado, em toda a sua extensão, em uma amostragem da casuística (30 casos).

Foram identificadas 49 variações genéticas e destas, 86,7% provocam troca de aminoácidos na cadeia polipeptídica. Apenas 8 dessas variações já foram descritas e, é digno de nota que algumas delas está envolvida, *in vitro*, como menor resposta imune antiviral (figura 4). Gad e colaboradores (2009) estimaram a estrutura cristalográfica da *IL28B* e sugeriram um modelo para a interação com o seu receptor (complexo IFN- λ R1 e IL10R2). Nesse mesmo estudo, demonstraram que algumas mutações nas regiões de interação proteína-receptor, provocadas *in vitro*, reduziam a atividade antiviral dessa citocina, como a mutação R72H (arginina>histidina), observada em 5 pacientes da casuística analisada.

Embora análises *in silico* estejam ainda sendo conduzidos para avaliar a potencial interferência das variações genéticas inéditas encontradas na estrutura tridimensional da *IL28B*, ressaltamos algumas observações importantes quanto aos nossos achados: algumas variações ocorreram em regiões de ligação da proteína ao seu receptor e além disto, diversas substituições encontradas ao longo da estrutura terciária da proteína provocaram a troca de aminoácidos por outros pertencentes a grupos moleculares de polaridades e tamanhos distintos. A estrutura tridimensional da proteína é caracterizada pela polaridade de seus aminoácidos distribuídos ao longo de sua cadeia, ressaltando que os aminoácidos hidrofóbicos distribuem-se no interior da proteína, enquanto os hidrofílicos tendem a ocupar a superfície proteica. Sendo assim, a troca de aminoácidos por outro de classe distinta é particularmente importante na determinação da estrutura tridimensional das proteínas, bem como sua função e ligação à receptores, que podem acarretar perda de função e/ou outras consequências biológicas prejudiciais ao organismo

Meager e colaboradores (2005) já haviam demonstrado que os IFN- λ s inibem a proliferação de algumas linhagens celulares tumorais, tais como o LN319 células glioblastoma humano. Entretanto, até o presente momento não há estudos que demonstrem isso *in vivo*.

Sato e colaboradores (2006), investigaram a atividade antitumoral de IL29B nas linhagens celulares murinas melanoma (B16) e tumores de cólon (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*.

Os achados do presente trabalho estimulam análises futuras para avaliar se as alterações encontradas podem interferir na estrutura tridimensional da IL28B, na interação com seu receptor (IL28R1) e possível interferência em suas funções biológicas.

Conclusão

5. CONCLUSÃO

Em face dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Não houve diferença entre as frequências alélica e genotípica do polimorfismo *rs12979860 C/T* entre os indivíduos acometidos por astrocitoma e os indivíduos controle.
- Foram detectadas diversas variações genéticas no gene *IL28B* na casuística analisada
- Significativo número das variações genéticas encontradas não foram ainda descritas na literatura.
- O significado molecular ou clínico da maioria das variações genéticas observadas é desconhecido.
- Os achados nos estimulam a realização de estudos *in silico* para avaliar se as alterações encontradas podem interferir na estrutura tridimensional da proteína e possível interferência em suas funções biológicas.

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.

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

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.

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

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.

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.

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.A.; SHEPPARD, P.O.; O'HARA, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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

PIEMONTE, 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.

SHEPPARD, P. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nature Immunology**, 2004, v. 4, n. 1.

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

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

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

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.

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.