

SIMONE MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA ORIGINAL SIMPLIFICADO PARA A
ANÁLISE DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO GENE *IL28B***

Joinville - SC

2012

SIMONE MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA ORIGINAL SIMPLIFICADO PARA A
ANÁLISE DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO GENE *IL28B***

Dissertação apresentada como requisito final para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE. Orientador: Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho. Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

Joinville - SC

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

“Desenvolvimento de um Sistema Original Simplificado para a Análise de Polimorfismos Relacionados ao Gene *IL28B*”

por

Simone Moreira

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente.

Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Coordenador do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coorientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Anderson Ricardo Roman Gonçalves
(UNIVILLE)

Prof. Dr. João Renato Rebello Pinho
(Universidade de São Paulo – USP)

Joinville, 16 de abril de 2012.

Aos meus pais
Edgar e Ivone pelo eterno incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar sempre nos momentos difíceis, me mostrar o caminho nas horas incertas e me proporcionar essa grande vitória.

À minha família pelo amor, carinho e incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho e ao coorientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França por acreditarem em mim, por me ajudarem a trilhar o caminho da ciência e por serem exemplos de pesquisadores.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular pelo apoio, carinho e amizade.

A Andréia Gutberlet, Bruna Cristina Bertol e Leslie Ecker Ferreira pela extrema dedicação.

Às professoras Maristela Adamovski e Roseneide Campos pelo grande incentivo.

Aos meus amigos, melhores amigos, pelo amor, carinho e força.

Aos professores do curso pela dedicação e aprendizado.

Aos amigos de classe por todo carinho e apoio.

RESUMO

Introdução: Atualmente, a combinação de interferon alfa peguilado (PegIFN- α -2a/2b) mais ribavirina (RBV) durante 24 a 72 semanas, constitui o tratamento preconizado para os pacientes com hepatite C crônica. No entanto, muitos pacientes, principalmente aqueles infectados pelo genótipo 1 do HCV, não alcançam a Resposta Viroológica Sustentada (RVS), definida como ausência de RNA viral no soro seis meses após o final do tratamento. Uma ampla investigação do genoma humano identificou variantes genéticas fortemente associadas com a resposta ao tratamento da hepatite C (GE *et al.*, 2009). Particularmente, dois Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP), denominados rs12979860 e rs8099917, localizados próximo ao gene *IL28B* no cromossomo 19, foram associados à RVS. **Objetivo:** O presente estudo teve por objetivo desenvolver um sistema original simplificado para a análise dos SNPs rs12979860 e rs8099917 capaz de ser utilizado na prática clínica. **Material e Métodos:** As amostras de sangue foram coletadas no Hemocentro de Joinville/Brasil, sendo realizada, a seguir, a extração do DNA genômico. Para o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional pretendida, obteve-se o mapa gênico e os *loci* de interesse, com auxílio das sequências disponíveis no GenBank. Utilizando-se o *software Primer3* v.0.4.0, foram desenhados dois pares de *primers* para amplificação dos segmentos gênicos contendo os SNPs selecionados. Para a definição dos genótipos, foi estabelecida a técnica de análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (RFLP), tendo sido identificadas endonucleases capazes de distinguir as variantes pesquisadas na base de dados *online* REBASE. Algumas amostras representativas foram submetidas à técnica de sequenciamento automatizado para a validação da metodologia proposta. **Resultados:** A termociclagem foi definida com vistas à amplificação simultânea dos dois *loci* investigados. Após a PCR, os *amplicons* foram digeridos pelas endonucleases respectivas selecionadas (*Hpy*166II – rs12979860 e *Bsr*DI – rs8099917). Os padrões genotípicos observados através da PCR-RFLP desenvolvida foram comprovados pelo sequenciamento. **Conclusões:** Todos os genótipos correspondentes aos SNPs investigados – rs12979860 (C/C, C/T e T/T) e rs8099917 (T/T, T/G e G/G) – foram identificados. Portanto, o método proposto constitui uma técnica simples e confiável para a determinação dos principais SNPs do gene *IL28B*, permitindo sua utilização nos laboratórios de apoio associados aos centros de tratamento de hepatite C. Assim, em conjunto com outros marcadores clínicos e laboratoriais, a genotipagem simplificada dos SNPs do gene *IL28B* permitirá maior confiabilidade na predição de resposta ao tratamento baseado em IFN em pacientes com hepatite C crônica.

Palavras chave: Hepatite C, *IL28B*, Polimorfismos de Nucleotídeo Único.

ABSTRACT

Introduction: Currently, the combination of pegylated interferon alfa (PegIFN- α -2a/2b) and ribavirin (RBV) for 24 to 72 weeks is the treatment recommended for patients with chronic hepatitis C. However, many patients, do not achieve Sustained Virological Response (SVR), defined as the absence of viral RNA in serum six months after the end of treatment, particularly those infected with HCV genotype 1. A wide investigation of the human genome identified genetic variants strongly associated with response to treatment of hepatitis C (GE *et al.*, 2009). Notably, two Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), rs12979860 and rs8099917, located close to gene *IL28B* on chromosome 19 were associated with SVR. **Aim:** This study aimed to develop a simplified original system to analyze the SNPs rs12979860 and rs8099917, which could be employed in clinical practice. **Methods:** Blood samples were collected at the Blood Center of Joinville/Brazil, followed by genomic DNA extraction. For the development of the intended standard Polymerase Chain Reaction (PCR), we retrieved the genomic map and the loci of interest using sequences available at Genbank. Two pairs of primers were designed for the amplification of gene segments containing the selected SNPs with the employment of Primer 3 software v.0.4.0. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis was established for the definition of genotypes. Endonucleases able of distinguishing the variants studied were identified in the online database REBASE. Some representative samples were submitted to automated sequencing technique for validating the methodology proposed. **Results:** The thermocycling was defined for the simultaneous amplification of both loci investigated. After PCR, amplicons were digested by selected respective endonucleases (*Hpy166II* – rs12979860 and *BsrDI* – rs8099917). The genotypic patterns observed by PCR-RFLP were confirmed by sequencing. **Conclusions:** All genotypes corresponding to the SNPs investigated – rs12979860 (C/C, C/T, and T/T) and rs8099917 (T/T, T/G, and G/G) – were identified. Therefore, the methodology proposed constitutes a simple and reliable technique for the definition of major *IL28B* SNPs, allowing its use in the laboratories associated to centers of hepatitis C treatment. Accordingly, along with other clinical and laboratory markers, the simplified genotyping of *IL28B* SNPs will allow greater reliability in predicting response to IFN-based treatment in patients with chronic hepatitis C.

Keywords: Hepatitis C, *IL28B*, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| A | Adenina |
| AA | Africanos-Americanos |
| BLAT | <i>Basic Local Aligment Tool</i> |
| BLAST® | <i>Basic Local Aligment Search Tool</i> |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin/Albumina bovina</i> |
| pb | Pares de bases |
| C | Citosina |
| CA | Caucasianos-Americanos |
| CEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CHC | Carcinoma Hepatocelular |
| CONEP | Comissão Nacional de Ética em Pesquisa |
| dATP | 2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato |
| dCTP | 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato |
| dGTP | 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato |
| dTTP | 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato |
| DMSO | <i>Dimethyl Sulfoxide/Dimetilsulfóxido</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid/Ácido Desoxirribonucleico</i> |
| ddNTPs | <i>Dideoxynucleoside Triphosphate/Dideoxinucleosídeo trifosfato</i> |
| dNTPs | <i>Deoxynucleoside Triphosphate/Deoxinucleosídeos trifosfatados</i> |
| EDTA | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid/Ácido Etilenodiaminotetracético</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| G | Guanina |
| GWAS | <i>Genome-Wide Association Study/Estudo de Associação Ampla do Genoma</i> |
| HCV | <i>Hepatitis C Virus/Vírus da Hepatite C</i> |
| HEMOSC | Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus/Vírus da Imunodeficiência Humana</i> |
| IC | Intervalo de Confiança |
| IFN | Interferon |
| IL28B | Interleucina 28B |

| | |
|-------------------|---|
| IRF | <i>Interferon-Regulatory Factor</i> /Fator Regulatório de Interferon |
| ISDR | <i>Interferon Sensitivity Determining Region</i> /Região Determinante de Sensibilidade ao Interferon |
| ISG | <i>Interferon-Stimulated Gene</i> /Genes Estimulados por Interferon |
| ISGF | <i>Interferon-Stimulated Gene Factor</i> /Fator de Gene Estimulado por Interferon |
| ISRE | <i>Interferon-Stimulated Response Element</i> /Elemento de Resposta Estimulado por Interferon |
| Jak | <i>Janus kinase</i> /Janus cinase |
| Log | Logaritmo |
| Mg ²⁺ | Íon magnésio |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| mM | Milimoles |
| mL | Mililitros |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> /Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA |
| ng | Nanograma |
| OR | Odds Ratio/Medida de Associação |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> /Reação em Cadeia da Polimerase |
| PegIFN- α | <i>Pegylated Interferon alfa</i> /Interferon alfa Peguilado |
| pmol | Picomoles |
| R | Receptor |
| RBV | <i>Ribavirin</i> /Ribavirina |
| RFLP | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> /Análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> /Ácido Ribonucleico |
| RV | Resposta Viroológica |
| RVN | Resposta Viroológica Nula |
| RVP | Resposta Viroológica Precoce |
| RVR | Resposta Viroológica Rápida |
| RVS | Resposta Viroológica Sustentada |
| R70Q | Arginina 70 Glutamina |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> /Polimorfismo de Nucleotídeo Único |

| | |
|----------|--|
| STAT | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> /Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição |
| T | Timina |
| TA | Temperatura de Anelamento |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TAE | Tris/Acetato/EDTA |
| TBE | Tris/Borato/EDTA |
| TCLE | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TM | <i>Melting Temperature</i> /Temperatura de fusão |
| TPMT | <i>Thiopurine Methyltransferase</i> /Tiopurina Metiltransferase |
| Tris | <i>Hydroxymethylaminomethane</i> /Hidroximetilaminometano |
| TYK | <i>Tyrosina kinase</i> /Tirosina cinase |
| U | Unidade |
| UI | Unidades Internacionais |
| UNIVILLE | Universidade da Região de Joinville |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| μg | Microgramas |
| ΔG | Delta G |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Taxa de RVS por genótipo referente ao SNP rs12979860 e por grupo populacional..... | 29 |
| Figura 2 - Cromossomo 19..... | 42 |
| Figura 3 - Gene <i>IL28B</i> | 44 |
| Figura 4 - Via de sinalização Jak-STAT..... | 44 |
| Figura 5 - Representação esquemática da PCR..... | 50 |
| Figura 6 - Representação esquemática da discriminação alélica analisada via clivagem enzimática seguida de eletroforese em gel (RFLP)..... | 58 |
| Figura 7 - Representação esquemática do Ensaio TaqMan®..... | 62 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 14 |
| 1 OBJETIVOS | 16 |
| 1.1 Objetivo Geral..... | 16 |
| 1.2 Objetivos Específicos..... | 16 |
| 2 REVISÃO | 18 |
| 2.1 Hepatite C..... | 18 |
| 2.1.1 Introdução | 18 |
| 2.1.2 Tratamento..... | 19 |
| 2.1.3 Fatores que Influenciam na Resposta ao Tratamento | 24 |
| 2.2 Hepatite C e Genética: Polimorfismos Relacionados ao Gene <i>IL28B</i> | 27 |
| 2.2.1 Polimorfismo rs12979860..... | 28 |
| 2.2.2 Polimorfismo rs8099917 | 32 |
| 2.2.3 <i>IL28B</i> e Genótipo Viral | 35 |
| 2.2.4 <i>IL28B</i> e Coinfecção HCV/HIV | 37 |
| 2.2.5 <i>IL28B</i> e Cinética Viral | 38 |
| 2.2.6 <i>IL28B</i> e Transplante Hepático | 39 |
| 2.2.7 <i>IL28B</i> e Terapia Tripla (PegIFN/RBV e boceprevir/telaprevir)..... | 40 |
| 2.2.8 O gene <i>IL28B</i> e o Mecanismo Patogênico | 42 |
| 2.3 Métodos de Análise de SNPs..... | 45 |
| 2.4 Técnicas Utilizadas para Genotipagem de SNPs | 48 |
| 2.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR)..... | 48 |
| 2.4.1.1 Componentes da PCR..... | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.1.2 Otimização da PCR..... | 52 |
| 2.4.2 Análise de Polimorfismo de Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP</i>) | 58 |
| 2.4.3 PCR em Tempo Real | 60 |
| 2.4.4 Sequenciamento | 62 |
| 2.5 Bioinformática..... | 64 |
| 2.5.1 Planejamento de Oligonucleotídeos..... | 65 |
| 2.5.2 Bases de Dados para a Determinação de Endonucleases | 67 |
| 3 METODOLOGIA | 69 |
| 3.1 Tipo e Método de Pesquisa..... | 69 |
| 3.2 Considerações Éticas e Proveniência das Amostras..... | 69 |
| 3.3 População-Alvo | 70 |
| 3.4 Quantidade de Amostras | 71 |
| 3.5 Procedimentos Metodológicos | 71 |
| 3.5.1 Bioinformática | 71 |
| 3.5.1.1 Aquisição de Sequências Nucleotídicas | 71 |
| 3.5.1.2 Pesquisa de Endonucleases | 72 |
| 3.5.1.3 Elaboração de Oligonucleotídeos..... | 73 |
| 3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase..... | 74 |
| 3.5.3 Análise de Polimorfismo de Comprimentos dos Fragmentos de Restrição | 75 |
| 3.5.4 Sequenciamento | 76 |
| 3.6 Local de Pesquisa..... | 77 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 78 |
| CONCLUSÕES | 95 |
| REFERÊNCIAS..... | 96 |

| | |
|--|------------|
| APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido | 107 |
| ANEXOS | 110 |

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do vírus da hepatite C (*Hepatitis C Virus* – HCV), várias pesquisas foram necessárias para o desenvolvimento de uma terapia específica que apresentasse bons resultados no tratamento da doença. Os primeiros protocolos de tratamento utilizando interferon (IFN) convencional e ribavirina (RBV) mostraram-se pouco satisfatórios para o genótipo 1 do HCV, obtendo-se uma melhor resposta clínica posteriormente, após a adição de um polímero de polietilenoglicol à molécula de IFN (CLARK e NELSON, 2009). Assim, atualmente, o esquema terapêutico de melhor resposta é a combinação de interferon peguilado alfa 2a ou alfa 2b (PegIFN- α -2a/2b) mais RBV (TSUBOTA *et al.*, 2011). Sabe-se, porém, que esse tratamento é ainda insuficiente em um grande número de pacientes para a obtenção da Resposta Viroológica Sustentada (RVS) (definida como ausência de HCV-RNA ao final do tratamento e seis meses após) (TANAKA *et al.*, 2009). Dentre os que persistem com a infecção, uma percentagem relevante irá apresentar doença hepática progressiva, evoluindo para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (SEEFF, 2002; WHO, 2011).

Os diversos fatores que influenciam na resposta ao tratamento estão relacionados tanto ao vírus quanto ao hospedeiro (TAI e CHUNG, 2009). Relativamente à influência atribuída ao hospedeiro, estudos recentes relatam a identificação de SNPs próximos ao gene *IL28B*, codificante do interferon lambda 3 (IFN- λ -3), os quais estão fortemente relacionados à resposta ao tratamento da hepatite C. Ge *et al.* (2009) utilizaram um estudo de associação ampla do genoma (*Genome-Wide Association Study* – GWAS) para identificar variantes genéticas

relacionadas à resposta ao tratamento da hepatite C crônica. Esse estudo demonstrou um SNP, rs12979860 (C/T), cujo alelo C apresentou maior possibilidade em alcançar RVS do que o alelo T. Thomas *et al.* (2009) relataram que o mesmo polimorfismo descrito por Ge *et al.* (2009) foi também associado com a eliminação espontânea do HCV. Demonstrou-se que o genótipo CC (rs12979860/CC) aumenta fortemente a resolução da infecção, com maiores chances de o indivíduo infectado eliminar o vírus espontaneamente do que o genótipo CT e TT.

Outros estudos identificaram um novo polimorfismo também associado com a resposta à terapia padrão da hepatite C crônica. Rauch *et al.* (2010), Suppiah *et al.* (2009) e Tanaka *et al.* (2009) encontraram o polimorfismo rs8099917 (T/G), localizado aproximadamente 8kb à frente do gene *IL28B*, e relataram sua associação com RVS e com Resposta Viroológica Nula (RVN). Nesse caso, os pesquisadores supõem que o alelo desfavorável, G, está associado tanto com a persistência da infecção como com a falha no tratamento.

Dentre as aplicações da biologia molecular, as metodologias para genotipagem de SNPs têm se desenvolvido muito nos últimos anos. Atualmente, há uma variedade de protocolos para a sua caracterização, porém, a maioria necessita de automações custosas e elevada habilidade de execução, como técnicas de hibridização e sequenciamento. Em razão da complexidade envolvida, a identificação dos polimorfismos em questão, encontra-se ainda restrita aos laboratórios de pesquisa. Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver uma ferramenta molecular simplificada, baseada num sistema novo, capaz de ser utilizada na prática clínica para a predição prognóstica de resposta ao tratamento da hepatite C.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um sistema original simplificado para a análise dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs), rs12979860 e rs8099917, localizados próximos ao gene *IL28B*, capaz de ser utilizado na prática clínica.

1.2 Objetivos Específicos

- Identificar a existência de endonucleases capazes de reconhecer uma das formas variantes dos polimorfismos rs12979860 (C/T) e rs8099917 (T/G);
- Planejar sequências de oligonucleotídeos capazes de permitir a amplificação e detecção das regiões contendo os polimorfismos em estudo;
- Padronizar uma metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) para a amplificação das regiões gênicas onde se encontram os polimorfismos;

- Padronizar uma metodologia de análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (RFLP) para a definição dos genótipos correspondentes aos polimorfismos rs12979860 (CC, CT e TT) e rs8099917 (TT, TG e GG).

2 REVISÃO

2.1 Hepatite C

2.1.1 Introdução

A hepatite C é uma doença inflamatória do fígado, resultante da infecção com o HCV (WHO, 2011). O HCV foi descoberto em 1989, nos Estados Unidos (CHOO *et al.*, 1989; ECDC, 2010, web), sendo hoje o principal agente etiológico da hepatite crônica no ocidente, anteriormente conhecida como hepatite pós-transfusional não-A e não-B (BRASIL, 2008).

O HCV é um vírus RNA de fita simples, membro do gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae* (BARTENSCHLAGER e BÜHLER, 2010, web). É classificado em seis genótipos principais (denominados de 1 a 6) e uma variedade de subtipos, baseando-se na heterogeneidade das sequências genômicas. Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial; os genótipos 4 e 5 são encontrados principalmente na África e o genótipo 6 é mais comumente distribuído na Ásia (WHO, 2011, web). Recentemente, o genótipo 7 do HCV foi encontrado em pacientes do Canadá e Bélgica, que foram possivelmente infectados na África Central (MURPHY *et al.*, 2007). No Brasil, os genótipos mais encontrados são 1, 2 e 3, com predominância do genótipo 1 seguido pelo genótipo 3 (CAMPIOTTO, 2005).

A transmissão do HCV ocorre pelo contato com sangue contaminado devido à exposição percutânea, transfusão de sangue e/ou hemoderivados, e transplantes de doadores infectados. Destacam-se, atualmente, como importantes formas de

transmissão do HCV, o compartilhamento de equipamentos para uso de drogas, colocação de *piercings* e confecção de tatuagens, além de objetos de uso pessoal, como escovas de dente, lâminas de depilar ou barbear e instrumentos para pedicure/manicure. A transmissão sexual é pouco frequente e ocorre principalmente em pessoas que apresentam prática sexual de risco (com múltiplos parceiros e sem utilização de preservativo). Além disso, a coinfeção com algum agente causal de doença sexualmente transmissível, como por exemplo o HIV, é um facilitador para a transmissão sexual (BRASIL, 2011). A transmissão vertical é baixa, 3 a 5%. Entretanto, gestantes com infecção simultânea com o HIV demonstram maior risco de transmissão de hepatite C para o recém-nascido, atingindo até 15% (ECDC, 2010, web).

A incidência de hepatite C é alta. Estima-se que 130 a 170 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas cronicamente com o HCV e em risco de desenvolver cirrose hepática e CHC. Mais de 350 mil pessoas morrem de doenças do fígado relacionadas à hepatite C a cada ano (WHO, 2011). Segundo o Ministério da Saúde, há cerca de 4 milhões de indivíduos infectados com HCV no Brasil.

A maioria (60 a 70%) das infecções por HCV persiste, ocasionando doença hepática crônica; 5 a 20% desenvolvem cirrose; e 1 a 5% morrem de cirrose ou CHC (WHO, 2011). É importante destacar, também, que a hepatite C é a maior responsável por cirrose e transplante hepático no Ocidente (BRASIL, 2008).

2.1.2 Tratamento

O tratamento para hepatite C crônica tem como objetivo diminuir a progressão da doença hepática por inibição da replicação viral, resultando numa redução da atividade inflamatória e impedindo a evolução para cirrose e CHC. Dessa forma, o tratamento proporciona uma melhora na qualidade de vida dos pacientes (BLATT *et al.*, 2009).

Inicialmente, a única medicação disponível para o tratamento da hepatite C era o IFN- α . Como agente único, o sucesso era limitado, apresentando baixas taxas de RVS (CLARK e NELSON, 2009). Os interferons apresentam efeito antiviral, imunomodulatório e antiproliferativo (CANO; LÓPEZ e RODRÍGUEZ, 2007). São proteínas produzidas naturalmente por diversas células, principalmente as do sistema imunológico, apresentando efeitos complexos na imunidade e na função celular (ABBAS; LICHTMAN e PILLAI, 2008; SHEPHERD *et al.*, 2007).

O passo seguinte na evolução da terapia da hepatite C foi a adição de RBV ao esquema terapêutico, melhorando, assim, as taxas de RVS (CLARK e NELSON, 2009). A RBV, sintetizada na década de 70, é um análogo nucleotídico purínico com efeito virostático. O mecanismo antiviral da RBV ainda não é completamente elucidado. Parece apresentar um efeito sinérgico, potencializando a ação do IFN- α (ESCOBAR, 2006). Estudos indicam que a RBV apresenta um efeito mutagênico sobre o genoma do HCV, provavelmente ocasionando mutações letais (HOFMANN *et al.*, 2007).

A administração do IFN convencional, utilizada ainda em alguns casos, é realizada três vezes por semana (BRASIL, 2011). O desenvolvimento de uma nova fórmula, o PegIFN- α , possibilitou a administração semanal do medicamento. O acréscimo de um polímero de polietilenoglicol à molécula de IFN resulta, ao final, numa molécula com peso molecular maior, com tempo de meia-vida prolongado e,

mais importante, uma resposta clínica superior quando administrado uma vez por semana (CLARK e NELSON, 2009).

Dessa forma, o tratamento recomendado para a hepatite C crônica hoje, é uma combinação de PegIFN- α -2a/2b mais RBV (TSUBOTA *et al.*, 2011).

O esquema geral de tratamento dos pacientes portadores de hepatite C crônica é protocolado pelo Ministério da Saúde (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções – 2011). A terapia recomendada aos pacientes portadores do genótipo 1, 4 ou 5 do HCV é a associação de PegIFN e RBV, uma vez por semana, durante 48 a 72 semanas. Deve-se considerar a duração do tratamento por 72 semanas para pacientes portadores do genótipo 1, 4 ou 5, os quais estejam em tratamento com PegIFN associado a RBV e que apresentem boa adesão, com Resposta Viroológica Precoce parcial (RVP) na 12^a semana e HCV-RNA indetectável na semana 24, levando em consideração aspectos de adesão, tolerabilidade e aceitabilidade (BRASIL, 2011).

Para os pacientes portadores de genótipo 2 ou 3 do HCV, o esquema recomendado para o tratamento, na ausência de fatores preditores de baixa RVS, é a administração de IFN convencional associado à RBV, três vezes por semana, durante 24 semanas. Pacientes que apresentem fatores preditores de má resposta ao tratamento como fibrose, manifestações clínicas de cirrose e/ou carga viral superior a 600.000 UI/mL, devem receber tratamento com PegIFN (BRASIL, 2011).

Em pacientes coinfetados HIV/HCV (independentemente do genótipo do HCV), o tratamento baseia-se no PegIFN associado a RBV, uma vez por semana, durante 48 semanas. Pacientes coinfetados com genótipos 1, 4 ou 5 do HCV, que estejam recebendo o tratamento e apresentando boa adesão, RVP parcial e negatificação do HCV-RNA na 24^a semana, podem ser considerados, opcionalmente,

para o prolongamento do tratamento para 72 semanas, considerando aspectos de aceitabilidade e tolerabilidade (BRASIL, 2011).

Os pacientes monoinfetados, portadores dos genótipos 1, 4 ou 5 do HCV e coinfetados com HIV/HCV (independentemente do genótipo do HCV), após 12 semanas de tratamento, se não apresentarem o exame de HCV-RNA negativo ou uma redução igual ou superior a 2 log (100 vezes) do número de cópias virais em relação à carga viral pré-tratamento, devem ter o tratamento suspenso, sendo considerados não respondedores (BRASIL, 2011).

O tratamento visa obter uma RVS, confirmada por ensaio negativo de PCR (TANAKA *et al.*, 2009), aumentando a expectativa de vida, reduzindo a probabilidade de evolução para insuficiência hepática terminal e diminuindo o risco de transmissão da doença (BRASIL, 2011). Sabe-se, porém, que muitos pacientes não são curados pelo tratamento. Isso se deve tanto pela eficácia limitada quanto pelos efeitos adversos conferidos pela terapia, o que proporciona a desistência dos pacientes antes de completarem o esquema terapêutico (GE *et al.*, 2009).

Segundo o Ministério da Saúde, os principais critérios de resposta virológica para avaliação do tratamento são (BRASIL, 2011):

- a) Resposta Viroológica Rápida (RVR): definida como HCV-RNA indetectável na 4^a semana de tratamento;
- b) Resposta Viroológica Precoce (RVP): definida como a queda de pelo menos 2 log, ou 100 vezes, o valor do HCV-RNA pré-tratamento (RVP parcial), ou sua indetectação (RVP total) na 12^a semana de tratamento;
- c) Resposta Viroológica Sustentada (RVS): definida como HCV-RNA indetectável 6 meses após o término do tratamento;

d) Resposta Viroológica Nula (RVN): definida como indivíduo que não apresenta pelo menos RVP parcial.

Estudos têm demonstrado a forte correlação entre a queda dos níveis do HCV RNA nas primeiras semanas de tratamento e o alcance da RVS (GHANY *et al.*, 2009; KANDA; IMAZEKI e YOKOSUKA, 2010).

Em maio de 2011, dois novos medicamentos foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da hepatite C crônica. Boceprevir (Victrelis, Merck), aprovado em 13 de maio de 2011, foi a primeira nova droga em 20 anos para o tratamento da infecção por HCV, seguido pelo Telaprevir (Incivek, Vertex), aprovado no dia 23 do mesmo mês. Esses novos medicamentos são considerados um avanço na terapia e uma mudança no paradigma do tratamento da hepatite C (MAGGON, 2011, web).

Boceprevir e Telaprevir são inibidores da protease do HCV, biodisponíveis oralmente, capazes de formar um complexo covalente, mas reversível com a proteína NS3/4A do vírus (HOFMANN e ZEUZEM, 2011). A eficácia e a segurança da combinação de Boceprevir ou Telaprevir com PegIFN- α mais RBV foram comprovadas em estudos com pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV (HOFMANN e ZEUZEM, 2011).

As taxas de RVS foram superiores nos pacientes tratados com a adição de Boceprevir, comparados com aqueles que receberam apenas a terapia padrão da hepatite C. Daqueles que receberam a terapia tripla por 44 semanas, cerca de 66% alcançaram a RVS, enquanto dos que receberam a terapia padrão por 48 semanas, 37% apenas alcançaram a resposta pretendida (BRONOWICKI *et al.*, 2010; HOFMANN e ZEUZEM, 2011; POORDAD *et al.*, 2010).

Os estudos com Telaprevir obtiveram resultados semelhantes. As taxas de RVS também foram superiores quando adicionado o inibidor de protease à terapia padrão. Cerca de 75% dos pacientes que receberam Telaprevir em adição à PegIFN- α -2a e RBV alcançaram a RVS, enquanto 44% dos pacientes que receberam apenas a terapia padrão alcançaram tal resposta (HOFMANN e ZEUZEM, 2011; JACOBSON *et al.*, 2010).

Esses novos medicamentos já foram aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para utilização no Brasil, porém ainda não estão sendo fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Prevê-se que as duas novas drogas sejam incorporadas ao protocolo terapêutico de tratamento da hepatite C e ofertadas na rede pública de saúde apenas no segundo semestre de 2012 (SBH, 2011, web; ANVISA, 2011, web). Dessa forma, esses medicamentos poderão fazer parte do protocolo terapêutico de tratamento da hepatite C, aumentando, assim, a RVS dos pacientes.

2.1.3 Fatores que Influenciam na Resposta ao Tratamento

A terapia à base de IFN falha em muitos pacientes provavelmente devido à combinação de fatores virais e do hospedeiro (TAI e CHUNG, 2009). Há diversos trabalhos que estudaram os fatores virais e individuais determinantes à efetividade ao tratamento da hepatite C crônica, entre eles, o genótipo do HCV, carga viral pré-tratamento e cinética do vírus durante a terapia; etnia, idade, peso, e presença de esteatose e/ou fibrose.

O genótipo do HCV é um dos preditores basais mais importantes em relação à resposta para a terapia à base de IFN. Isso tem sido demonstrado em diversos estudos e, geralmente, pacientes infectados com genótipo 1 do HCV são menos prováveis a alcançar a RVS do que os pacientes infectados com outros genótipos virais (KAU; VERMEHREN e SARRAZIN, 2008). O PegIFN mais RBV produz taxas de RVS de 42 a 52% para o genótipo 1, 66 a 72% para o genótipo 4 e 76 a 80% para os genótipos 2 e 3. Dessa forma, fica claro que o genótipo viral é fator preditivo determinante para o alcance da RVS (NGUYEN-KHAC *et al.*, 2007).

A carga viral (unidades de vírus em cada mililitro de soro) pré-tratamento também foi apontada, em alguns estudos, como sendo fator prognóstico de resposta à terapia para hepatite C (FERNANDES, 2008; KAU; VERMEHREN e SARRAZIN, 2008). De acordo com o Protocolo Clínico Terapêutico (BRASIL, 2011), uma das características associadas ao sucesso do tratamento é a presença de carga viral basal abaixo de 600.000 UI/mL.

Além das características inerentes ao vírus, estudos de cinética viral relatam que alterações na carga viral durante a fase inicial de tratamento podem ser empregadas para caracterizar os pacientes com maior probabilidade de alcançar a RVS (FERNANDES, 2008; GHANY *et al.*, 2009; KANDA *et al.*, 2010). A partir da primeira semana de tratamento, o declínio significativo do HCV-RNA prevê, de maneira apurada, a ocorrência de RVS em pacientes tratados com PegIFN e RBV. A ausência desse declínio até o início da semana 12 de tratamento é um indício de que o paciente não responderá à terapia (CARLSSON *et al.*, 2005). Recentemente, a RVR consolidou-se como um importante marcador da obtenção de RVS (ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA, 2009). Sugere-se, então, que a ausência de HCV-RNA à 4ª semana de tratamento

possui um elevado valor preditivo positivo; por outro lado, a incapacidade de atingir a RVP (à 12ª semana) representa um importante valor preditivo negativo (FERENCI *et al.*, 2005; ZEUZEM *et al.*, 2006). O HCV utiliza múltiplas estratégias para escapar da resposta imunológica. A persistência da infecção viral indica que o HCV interfere nos mecanismos de defesa do hospedeiro (REHERMANN, 2009; ZEISEL; COSSET e BAUMERT, 2008). A taxa de RVS ao tratamento padrão com IFN e RBV é dependente do genótipo do HCV e a cinética viral durante o tratamento influi na eliminação viral (LEE e FERENCI, 2008).

Em um estudo recente de Enomoto e Maekawa (2010), a sequência inteira de aminoácidos das proteínas expressas pelo HCV foi determinada e analisada de acordo com a resposta viral durante o curso de tratamento. Mutações na região ISDR (*Interferon Sensitivity Determining Region* – região determinante de sensibilidade ao interferon) da proteína viral NS5A estão associadas à RVR. Adicionalmente, a mutação arginina70glutamina (R70Q) na proteína do core está associada à ausência de RVP. Isso indica que essas proteínas são fatores importantes em relação à cinética viral durante a terapia com PegIFN e RBV.

Sabe-se que há fatores do hospedeiro que estão associados à resposta ao tratamento da hepatite C crônica, os quais, de um modo geral, podem dividir-se em fixos e modificáveis. Os fatores fixos mais importantes são a etnia e a idade. A etnia é o fator fixo mais forte do hospedeiro em resposta ao tratamento (TAI e CHUNG, 2009). Estudos comparando o efeito do PegIFN e RBV em Africanos-Americanos (AA) versus Caucasianos-Americanos (CA), infectados com o genótipo 1 do HCV, demonstraram que AA, alcançam taxas de RVS significativamente mais baixas que CA (CONJEEVARAM *et al.*, 2006; HOWELL *et al.*, 2008). No que diz respeito à idade, estudos comprovam que é um fator relevante a ser considerado em relação à

resposta ao tratamento para hepatite C. Indivíduos jovens conseguem maior resposta terapêutica que indivíduos de maior idade (HUANG *et al.*, 2010).

Além dos fatores fixos do hospedeiro, fatores de risco modificáveis tais como, obesidade e esteatose hepática podem afetar adversamente o resultado do tratamento (TAI e CHUNG, 2009). A ausência de obesidade foi considerada uma característica associada ao sucesso terapêutico (BRASIL, 2011) e, segundo Kau, Vermehren e Sarrazin (2008) e Poynard *et al.* (2003), a inexistência de esteatose é um preditor de RVS.

Relacionada à história natural da infecção pelo HCV, a fibrose hepática no início do tratamento é um importante fator prognóstico de RVS; quanto mais avançado o estágio de fibrose pior é a RVS (BRASIL, 2011; KAU; VERMEHREN e SARRAZIN, 2008).

2.2 Hepatite C e Genética: Polimorfismos Relacionados ao Gene IL28B

Vários grupos têm investigado a associação de padrões genéticos do hospedeiro com a resposta virológica à terapia à base de IFN (KAU; VERMEHREN e SARRAZIN, 2008). Porém, até recentemente, todas as informações sobre os fatores genéticos do hospedeiro envolvidos na resposta à terapia antiviral ou na eliminação espontânea da infecção foram insuficientes (GARCIA *et al.*, 2011).

Em 2009, por meio de estudos de associação do genoma, conhecidos como GWAS, uma ampla investigação foi realizada em diferentes coortes populacionais para identificar variantes genéticas relacionadas à resposta ao tratamento para

hepatite C (GARCIA *et al.*, 2011; GE *et al.*, 2009; TANAKA *et al.*, 2009). O GWAS utiliza mapas de marcadores genéticos no genoma humano para procurar diferenças na frequência alélica entre casos e controles. Quando uma diferença na frequência é significativa, supõe-se que a região correspondente do genoma contém variantes que podem influenciar na característica de interesse analisada (ASSELAH, 2010). Os pesquisadores descreveram vários SNPs associados ao tratamento à base de IFN, localizados no cromossomo 19 (19q13), próximos aos genes que codificam a família IFN- λ . Aqueles com maior associação com a resposta ao tratamento foram detectados próximos ao gene *IL28B* (codificante do IFN- λ -3), denominados como rs12979860 e rs8099917 (GE *et al.*, 2009; TANAKA *et al.*, 2009).

2.2.1 Polimorfismo rs12979860

Todos os pacientes incluídos no GWAS realizado por Ge *et al.* (2009) eram infectados com HCV genótipo 1 e foram envolvidos em um regime de tratamento com PegIFN- α -2a ou PegIFN- α -2b mais RBV (as duas preparações de IFN demonstraram eficácia similar) durante 48 semanas. Os indivíduos foram genotipados por meio da técnica de *microarray*, usando a plataforma Illumina Human610-quad BeadChip, à procura de determinantes à resposta ao tratamento. Os pesquisadores analisaram 1.137 pacientes e identificaram vários SNPs próximos ao gene *IL28B*, no cromossomo 19, os quais foram relacionados com a resposta ao tratamento da hepatite C. Um determinado polimorfismo, rs12979860, localizado 3kb à frente do gene *IL28B*, foi fortemente associado com RVS em todos os pacientes.

No que diz respeito à ancestralidade, os pacientes Europeus-Americanos mostraram uma associação do genótipo CC (rs12979860/CC) com taxa de RVS duas vezes maior (1,8 – 2,3; 95% IC) que o genótipo TT (rs12979860/TT). Resultados similares foram encontrados em Africanos-Americanos, com taxa de RVS três vezes maior (1,9 – 4,7; 95% IC) e em Hispânicos, com taxa de RVS duas vezes maior (1,4 – 3,2; 95% IC). Além disso, a frequência do genótipo CC em Europeus-Americanos, Africanos-Americanos e Hispânicos foi de 39, 16 e 35% (Figura 1). Segundo os autores, isso pode explicar as taxas de respostas distintas ao tratamento com PegIFN mais RBV entre esses grupos. A associação entre o polimorfismo e a RVS determina, aproximadamente, metade das diferenças nas taxas de resposta ao tratamento à base de IFN entre pacientes com ancestralidade europeia e aqueles com ancestralidade africana (GE *et al.*, 2009).

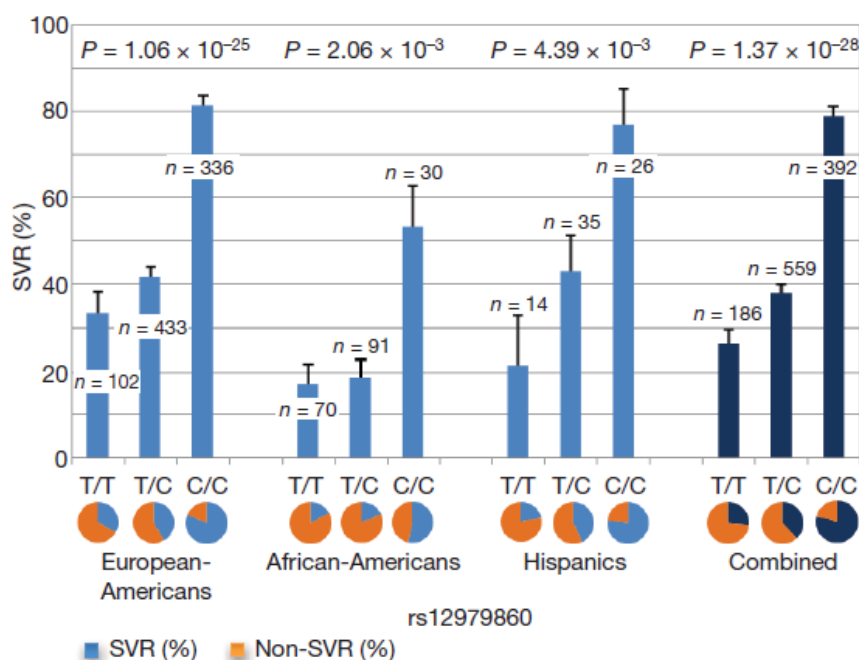


Figura 1 - Taxa de RVS por genótipo referente ao SNP rs12979860 e por grupo populacional
Fonte: Ge *et al.* (2009)

Resultados semelhantes foram obtidos em uma pesquisa posterior, conduzida por Thompson *et al.* (2010), avaliando-se mais de 1.500 indivíduos infectados com o genótipo 1 do HCV. Nesse estudo, o genótipo CC do SNP rs12979860 também foi determinante para o aumento na resposta ao tratamento. A taxa de RVS foi o dobro em pacientes com esse genótipo comparada aos que apresentavam CT ou TT em todas as populações estudadas (Caucasianos: 69% CC, 33% CT e 27% TT – CC vs CT, $P < 0,0001$ e CC vs TT, $P < 0,0001$; Africanos-Americanos: 48% CC, 15% CT e 13% TT – CC vs CT, $P < 0,0001$ e CC vs TT, $P < 0,0001$; e Hispânicos: 56% CC, 38% CT e 27% TT – CC vs CT, $P = 0,0888$ e CC vs TT, $P = 0,0249$).

Os resultados encontrados por McCarthy *et al.* (2010) estenderam essas observações, indicando que, entre caucasianos, o polimorfismo rs12979860 tem uma alta especificidade na resposta ao tratamento, similar a um dos melhores indicadores basais, o genótipo do HCV, utilizado para identificar pacientes que provavelmente responderão à terapia antiviral contra a hepatite C. Eles estudaram 178 indivíduos caucasianos infectados por diferentes genótipos do HCV e relataram que o genótipo CC do polimorfismo rs12979860 conferia quase 6 vezes mais chances (OR 5,79) de alcançar RVS em comparação com os outros genótipos (CT/TT) (62% CC e 23% CT/TT; $P = 9 \times 10^{-6}$).

Thomas *et al.* (2009) relataram que o mesmo polimorfismo descrito por Ge *et al.* (2009) foi também associado com eliminação espontânea do HCV. Eles estudaram um total de 1.008 doentes com hepatite C, com ou sem coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da hepatite B (HBV). A variante rs12979860 foi avaliada em dois grupos de indivíduos: aqueles que eliminaram espontaneamente o HCV e os que persistiram com a infecção. Foi demonstrado que o genótipo CC (rs12979860/CC) aumenta fortemente a resolução da infecção,

com probabilidade de três vezes mais chance de eliminar o vírus espontaneamente do que os genótipos CT e TT combinados, tanto em pacientes com ancestralidade europeia como em ancestrais africanos. A eliminação viral ocorreu em 53% dos que apresentavam o genótipo CC e 28% daqueles com genótipos CT/TT, e a persistência da infecção ocorreu em 47% daqueles com genótipo CC e 72% dos que apresentavam CT/TT (CC vs CT/TT, $P = 3 \times 10^{-13}$).

Outro estudo realizado por Montes-Cano *et al.* (2010) em uma população espanhola também concluiu que o polimorfismo rs12979860 genótipo CC está associado com resolução espontânea da infecção. Eles analisaram 731 indivíduos (69 com resolução espontânea do vírus; 283 com infecção crônica por HCV de diferentes genótipos e 378 não infectados). Assim, 72,5% dos indivíduos que eliminaram espontaneamente o vírus apresentavam genótipo CC *versus* 27,5% dos que tinham genótipo CT/TT. No grupo de indivíduos com hepatite C crônica, 45,6% apresentavam genótipo CC e 54,4% genótipo CT/TT (o valor de P , comparando-se a eliminação espontânea do vírus e a infecção crônica, é de $6,2 \times 10^{-5}$). Além disso, o efeito do polimorfismo em resposta ao tratamento foi também evidenciado nesse estudo espanhol. No grupo que recebeu terapia combinada de IFN- α mais RBV ($n = 107$), dentre os que apresentavam falha na resposta virológica (resposta não sustentada), 73,1% apresentavam genótipos CT ou TT do SNP rs12979860 enquanto 26,9% apresentavam o genótipo CC. Por outro lado, 60% dos portadores do genótipo CC atingiram resposta sustentada, o que foi observado em apenas 40% daqueles dispostos dos genótipos CT ou TT ($P = 5,6 \times 10^{-4}$). No grupo controle (sem infecção viral), constatou-se que cerca de 40% dos indivíduos apresentavam o genótipo CC rs12979860.

Além disso, a frequência do alelo C foi analisada globalmente por genotipagem de 2.371 indivíduos de 51 populações do mundo. Foi encontrado um padrão interessante: a mais alta frequência é no leste da Ásia e Oceania (>90%); a mais baixa frequência, na África (<50%), e a intermediária, na Europa (THOMAS *et al.*, 2009). Isso pode explicar a diferença na frequência de eliminação viral e resposta ao tratamento entre essas populações.

Os polimorfismos relacionados ao gene *IL28B* só explicam parcialmente as diferenças na resposta ao tratamento da hepatite C entre os diferentes grupos étnicos, porém, dentro da mesma etnia, o *IL28B* é um importante preditor de resposta (GARCIA *et al.*, 2011).

2.2.2 Polimorfismo rs8099917

Outros estudos identificaram outro polimorfismo também associado com a resposta à terapia padrão da hepatite C. Rauch *et al.* (2010), Suppiah *et al.* (2009) e Tanaka *et al.* (2009) encontraram um polimorfismo, o rs8099917, localizado aproximadamente 8kb à frente do gene *IL28B*, que está em forte desequilíbrio de ligação com o SNP rs12979860 (o desequilíbrio de ligação é simplesmente definido como a associação não aleatória de alelos em *loci* ligados (JORDE, 2000). Eles relataram que o rs8099917 foi associado com RVS e com RVN.

Suppiah *et al.* (2009) inicialmente realizaram um estudo GWAS (utilizando o Illumina Infinium HumanHap300 ou o CNV370-Quad BeadChip) com 293 indivíduos australianos infectados com HCV genótipo 1 (162 não respondedores e 131

respondedores) e constataram que o polimorfismo rs8099917 é um preditor independente de resposta à terapia combinada para hepatite C. Nesse estudo de Suppiah *et al.* (2009), com mais 555 indivíduos de uma coorte europeia (coorte de replicação), a RVS foi alcançada em 55,9% de 442 pacientes com o genótipo TT (rs8099917/TT), em 36,4% de 357 com o genótipo TG (rs8099917/TG) e 30,6% de 49 com o genótipo GG (rs8099917/GG). Observou-se uma forte associação do alelo G com RVS, atingindo significância na análise geral do estudo (GWAS) e na coorte de replicação ($P = 9,25 \times 10^{-9}$).

Tanaka *et al.* (2009) realizaram outro estudo GWAS, utilizando uma plataforma diferente (Affymetrix SNP Array), que incluiu 142 pacientes japoneses com HCV genótipo 1 (78 com RVN e 64 com resposta virológica). Foram detectados sete SNPs relacionados com a resposta ao tratamento da hepatite C, dos quais o rs8099917 (T/G) foi o que melhor se correlacionou com a resposta à terapia (RVN vs RV, $P = 3,11 \times 10^{-15}$). Na coorte asiática total estudada, 314 pacientes (GWAS e coorte de replicação), a RVS foi alcançada em 63,8% de 196 pacientes com o genótipo TT, em 13,3% de 113 com genótipo GT e em nenhum dos cinco pacientes com o genótipo GG (RVN vs RVS, $P = 1,11 \times 10^{-27}$).

O estudo realizado por Rauch *et al.* (2010), analisou 1.362 pacientes com infecção aguda por HCV (347 apresentaram eliminação espontânea e 1.015 progrediram para a infecção crônica – grupo portador de diferentes genótipos do HCV). Do total de pacientes, 914 eram mono infectados por HCV e 448 co infectados por HCV/HIV. Entre os pacientes que eliminaram espontaneamente o vírus (com ou sem HIV associado), a frequência do genótipo TT, TG e GG do polimorfismo rs8099917 foi de 78, 21 e 1% (TT, $P = 3,37 \times 10^{-3}$; TG, $P = 1,23 \times 10^{-8}$; GG, $P = 6,07 \times 10^{-9}$), respectivamente. Dos pacientes com infecção crônica por HCV (sem HIV),

465 receberam o tratamento padrão com IFN e RBV. Assim, a frequência dos genótipos TT, TG e GG para os pacientes infectados cronicamente que atingiram RVS foi 68, 29 e 3%; e, entre aqueles que falharam na resposta ao tratamento, a frequência dos genótipos foi de 42, 51 e 7% (TT, $P = 3,62 \times 10^{-1}$; TG, $P = 3,11 \times 10^{-8}$; GG, $P = 6,30 \times 10^{-7}$), respectivamente. Esses dados sugerem que o alelo G do polimorfismo rs8099917 está associado tanto com persistência da infecção como com falha no tratamento.

Na Tabela 1, encontram-se os resultados de RVS por genótipo do *IL28B* descritos nos estudos citados anteriormente.

Tabela 1 - Comparação entre os genótipos favoráveis e desfavoráveis do *IL28B* em relação a RVS ao tratamento à base de IFN.

| SNP/Estudo | Etnia | N | Genótipo HCV | RVS (%) Genótipo favorável | RVS (%) Genótipo desfavorável |
|---------------------------|----------------|------|--------------|-------------------------------|----------------------------------|
| rs12979860 | | | | CC | CT/TT |
| Ge <i>et al.</i> | Caucasianos | 871 | 1 | 82 | 42/33 |
| | Afroamericanos | 191 | | 53 | 19/17 |
| | Hispanicos | 75 | | 77 | 43/21 |
| Thompson <i>et al.</i> | Caucasianos | 1171 | 1 | 69 | 33/27 |
| | Afroamericanos | 300 | | 48 | 15/13 |
| | Hispanicos | 116 | | 56 | 38/27 |
| McCarthy <i>et al.</i> | Caucasianos | 178 | 1/2/3 | 61 | 23/21 |
| Montes-Cano <i>et al.</i> | Caucasianos | 107 | 1/2/3/4 | 60 | 40(total) |
| rs8099917 | | | | TT | TG/GG |
| Suppiah <i>et al.</i> | Caucasianos | 848 | 1 | 56 | 36/31 |
| Tanaka <i>et al.</i> | Asiática | 314 | 1 | 64 | 13/0 |
| Rauch <i>et al.</i> | Caucasiano | 465 | 1/2/3 | 68 | 29/3 |

As informações sobre as variantes se fazem úteis para o futuro da terapia. É importante, por exemplo, identificar se pacientes que apresentarem o genótipo favorável receberão o tratamento atual padrão, enquanto os pacientes que apresentarem o genótipo desfavorável poderão ser tratados com uma nova droga em combinação com PegIFN e RBV (IMAZEKI; YOKOSUKA e OMATA, 2010).

Pacientes que são bons respondedores ao tratamento atual à base de IFN poderão ter uma diminuição na duração do tratamento. Dessa forma, a análise das variantes relacionadas ao gene *IL28B* proporcionará opções de tratamento individualizadas. Essa diminuição na duração do tratamento resultará em menores custos e influenciará na melhor aceitação do paciente ao tratamento (GEORGEL *et al.*, 2010).

2.2.3 *IL28B* e Genótipo Viral

Inicialmente, a maioria dos estudos que analisou a associação entre os polimorfismos relacionados ao gene *IL28B* e a resposta ao tratamento antiviral foi com pacientes infectados pelo genótipo 1 do HCV (GARCIA *et al.*, 2011). Em seguida, alguns trabalhos relacionaram os polimorfismos do gene *IL28B* e a resposta à terapia em pacientes infectados com diferentes genótipos virais.

Na pesquisa de Rauch *et al.* (2010), não foi observada associação significativa entre a variante genética rs8099917 (T/G) e a resposta ao tratamento entre indivíduos infectados com os genótipos 2 e 3 ($P = 0,18$), podendo indicar que o

valor prognóstico do alelo G pode ser limitado aos indivíduos com genótipos mais resistentes ao tratamento, como os genótipos 1 e 4.

O estudo de Mangia *et al.* (2010) incluiu 268 pacientes com genótipos 2 e 3 do HCV. Observou-se associação entre o *IL28B* (rs12979860) e a resposta ao tratamento em pacientes que não alcançaram RVR (n = 78; 87% CC, 67% CT, 29% TT; $P = 0,0002$). Os pacientes com genótipo CC do SNP rs12979860 que não obtiveram RVR apresentavam duas vezes mais chance (OR 4,0) de RVS do que aqueles sem o genótipo CC. Em contraste, em outro estudo realizado por Sarrazin *et al.* (2011), com uma coorte semelhante, observou-se associação significativa entre RVS e genótipo do SNP rs12979860 nos pacientes que alcançaram RVR ($P = 0,05$), enquanto naqueles pacientes que atingiram RVS, porém sem RVR, não houve associação ($P = 0,48$).

No estudo realizado por Moghaddam *et al.* (2011), o genótipo CC do SNP rs12979860 em comparação com CT/TT e o TT da rs8099917 em comparação com TG/GG mostraram associação com RVR, mas não com RVS à terapia combinada da hepatite C em pacientes infectados com o genótipo 3 do HCV. Para o SNP rs12979860, a RVR ocorreu em 84% dos que apresentavam genótipo CC vs 61% daqueles com CT/TT ($P = 3 \times 10^{-5}$) e, para a rs8099917, a RVR ocorreu em 78% dos que apresentavam o genótipo TT vs 56% daqueles com TG/GG ($P = 3,4 \times 10^{-4}$). Segundo os autores, isso pode sugerir que pacientes infectados pelo genótipo 3 do vírus e portadores dos genótipos favoráveis (rs12979860/CC e rs8099917/TT) relacionados ao gene *IL28B*, são mais prováveis a recidivar depois da resposta precoce ao tratamento.

Um estudo realizado por Asselah *et al.* (2012) demonstrou que o SNP rs12979860 está fortemente associado com RVS em pacientes infectados com o

HCV genótipo 4. Os pesquisadores estudaram 164 pacientes de diferentes etnias (Egípcios, Europeus e Africanos subsaarianos) e observaram que o alelo C (rs12979860) apresentou associação com RVS ($P = 0,0008$). As taxas de resposta foram 81,8%, 46,5% e 29,4% para os genótipos CC, CT e TT, respectivamente.

Além disso, muitos estudos demonstraram que o genótipo favorável CC do SNP rs12979860 foi mais frequente entre os pacientes infectados com genótipos 2 e 3 do HCV em relação aos pacientes com genótipo 1. Assim, algumas das diferenças na RVS entre os diferentes genótipos virais podem ser explicadas pelas variantes do *IL28B* (MCCARTHY *et al.*, 2010; MONTES-CANO *et al.*, 2010; SARRAZIN *et al.*, 2011).

2.2.4 *IL28B* e Coinfecção HCV/HIV

Os resultados obtidos com pacientes mono infectados pelo HCV têm sido capazes de ser reproduzidos em pacientes co infectados com HIV. Rallón *et al.* (2010) estudaram uma coorte de 164 pacientes co infectados HCV/HIV e observaram elevada associação entre o SNP rs12979860 e a resposta ao tratamento da hepatite C. Nesse estudo, as taxas de RVS em pacientes com genótipo CC foram de 75% comparadas com 38% daqueles com o genótipo CT ou TT ($P = 0,0001$). É importante destacar que, o efeito do SNP foi observado em pacientes portadores do HCV genótipo 1 e 4 e não do genótipo 3. Em outro estudo realizado por Pineda *et al.* (2010), analisou-se a resposta ao tratamento de 154 pacientes caucasianos HCV/HIV e observou-se que o genótipo CC do SNP rs12979860 também está

associado com maior chance de alcançar a RVS nesse grupo, principalmente nos portadores dos genótipos 1 ou 4 do HCV (a RVS foi alcançada em 71% dos que apresentavam genótipo CC vs 34% daqueles com CT/TT, $P < 0,001$).

Um estudo realizado por Aparicio *et al.* (2010) determinou o efeito do polimorfismo rs8099917 em resposta ao tratamento da hepatite C em pacientes coinfectados HCV/HIV. Os resultados revelaram que o alelo G foi fortemente associado com falha no tratamento (a falha ocorreu em 80% dos portadores do alelo G vs 48% dos que não apresentavam determinado alelo; $P < 0,0001$) e o genótipo TT foi um preditor de sucesso à terapia ($P = 0,021$). Nesse estudo, encontrou-se uma associação altamente significativa entre o alelo G da rs8099917 e a resposta à terapia em pacientes portadores do HCV genótipo 1 ($P < 0,0001$), mas não em pacientes infectados com o genótipo viral 3.

2.2.5 *IL28B* e Cinética Viral

Em um estudo realizado por Thompson *et al.* (2010), mais de 1.500 indivíduos (Caucasianos = 1171, Africanos-Americanos = 300 e Hispânicos = 116) infectados com genótipo 1 do HCV foram genotipados para o SNP rs12979860. Taxas de RVR, RVP e RVS foram comparadas por genótipo do *IL28B* nos três grupos étnicos. Em Caucasianos, o genótipo CC do polimorfismo rs12979860 foi associado com maior probabilidade de alcançar RVR (28% CC vs 5% CT e 5% TT, $P < 0,0001$), RVP (87% CC vs 38% CT e 28% TT, $P < 0,0001$) e RVS (69% CC vs 33% CT e 27% TT, $P < 0,0001$). Associação semelhante ocorreu em Africanos-Americanos e

Hispanicos. Dessa forma, existe uma relação entre o genótipo *IL28B* favorável (rs12979860/CC) e uma maior queda nos níveis de HCV/RNA durante as primeiras semanas de tratamento.

O polimorfismo rs12979860, por aumentar as taxas de eliminação viral na 4ª semana, na 12ª semana e na 48ª semana de tratamento, foi associado com aumento das taxas de RVS. Além disso, esse SNP associou-se à diminuição das taxas de recidiva após a terapia. Podem-se observar, então, dois benefícios desse polimorfismo no que diz respeito à cinética viral: o alcance de maior taxa de RVR que foi seguida, na maioria dos casos, por RVS; e o aumento em dobro (Caucasianos, 66% CC vs 31% CT e 24% TT, $P < 0,0001$) da taxa de RVS na maioria dos pacientes (>80%) que não alcançaram uma RVR (THOMPSON *et al.*, 2010).

2.2.6 *IL28B* e Transplante Hepático

Alguns estudos têm demonstrado a associação dos SNPs relacionados ao gene *IL28B* com resposta à terapia à base de IFN após transplante de fígado em pacientes com hepatite C recorrente. Segundo Charlton *et al.* (2011), a presença do genótipo CC do SNP rs12979860 no receptor (R) ou doador (D) foi associada com aumento nas taxas de RVS (D-não-CC/R-não-CC = 16%; D-CC/R-não-CC = 50%; D-não-CC/R-CC = 42%; D-CC/R-CC = 86%; $P = 0,0095$), concluindo-se que há maiores taxas de RVS quando D e R são portadores do genótipo favorável (rs12979860/CC). De acordo com os mesmos autores, os doadores que apresentam o genótipo CC do

polimorfismo rs12979860 deveriam ser preferencialmente alocados aos pacientes em estágio final de doença hepática devido à infecção pelo HCV. Fukuhara *et al.* (2010), ao analisar o polimorfismo rs8099917, detectaram que o genótipo TT, em R e D, foi fortemente associado com RVS (R, $P = 0,003$ e D, $P = 0,025$).

2.2.7 *IL28B* e Terapia Tripla (PegIFN/RBV e boceprevir/telaprevir)

A associação dos polimorfismos relacionados ao gene *IL28B* com a RVS após a adoção da terapia tripla para hepatite C vem sendo investigada. Akuta *et al* (2010) estudaram um grupo de japoneses infectados com HCV genótipo 1. Nesse estudo, os pacientes foram divididos em dois regimes terapêuticos, tratados com 12 semanas de telaprevir/PegIFN/RBV ($n = 20$) ou 12 semanas de terapia tripla seguida por um adicional de 12 semanas de PegIFN/RBV ($n = 61$). Os pesquisadores observaram que os polimorfismos rs12979860 (genótipo CC; OR 10,8; $P < 0,001$) e rs8099917 (genótipo TT; OR 13,6; $P < 0,001$) mantiveram-se como fortes preditores basais de resposta ao tratamento, apesar da adição de telaprevir à terapia padrão.

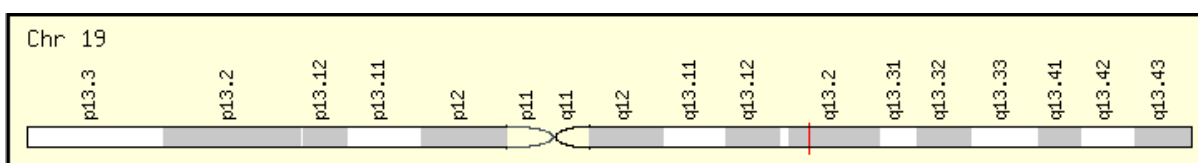
A análise das taxas de RVS por subtipo do *IL28B* foi realizada em 62% e 66% dos pacientes nos estudos SPRINT-2 (boceprevir para pacientes nunca tratados) e RESPOND-2 (boceprevir para pacientes previamente tratados). No grupo tratado com boceprevir/PegIFN/RBV no estudo SPRINT-2, os pacientes portadores do genótipo CC do SNP rs12979860 tiveram taxas de RVS mais altas que CT ou TT (CC vs CT/TT, $P < 0,0001$), porém, comparando-se com o grupo que recebeu apenas o tratamento padrão, o aumento proporcional em RVS foi maior nos

pacientes portadores dos genótipos CT ou TT. Entre os pacientes com falha no tratamento prévio, no estudo RESPOND-2, as taxas de RVS não foram claramente impactadas pelo *IL28B*. A adição de boceprevir ao esquema terapêutico aumentou significativamente as taxas de RVS em todos os genótipos do SNP rs12979860. Os autores concluíram que a RVR substituiu o valor preditivo do *IL28B* para RVS em ambos os grupos, não tratados e previamente tratados (JESUDIAN; GAMBARIN-GELWAN e JACOBSON, 2012; POORDAD *et al*, 2011).

A análise das taxas de RVS por subtipo do *IL28B* também foi realizada nos estudos com telaprevir, ADVANCE (telaprevir para pacientes nunca tratados) e REALIZE (telaprevir para pacientes previamente tratados). No estudo ADVANCE, 42% dos pacientes foram genotipados quanto ao SNP rs12979860. No grupo portador do genótipo CC, 90% dos indivíduos alcançaram RVS com 12 semanas de telaprevir vs 64% daqueles que receberam tratamento padrão. No grupo portador dos genótipos CT e TT, 71% e 73% dos pacientes que receberam 12 semanas de telaprevir alcançaram RVS comparados com 23 e 25% dos que receberam PegIFN/RBV (JACOBSON *et al.*, 2011; KWO, 2012). Dessa forma, o telaprevir melhorou as taxas de RVS em todos os subtipos do *IL28B*. Segundo os autores, pacientes portadores do genótipo CC foram mais prováveis a alcançar RVR e assim serem elegíveis para redução da duração da terapia (JESUDIAN; GAMBARIN-GELWAN e JACOBSON, 2012; JACOBSON *et al.*, 2011). No estudo REALIZE, 80% dos pacientes foram submetidos ao teste genético. Observou-se que o SNP rs12979860 não foi preditivo de resposta nessa população, concluindo-se que o seu uso é limitado na avaliação de pacientes previamente tratados que serão retratados com um regime baseado em telaprevir (JESUDIAN; GAMBARIN-GELWAN e JACOBSON, 2012; POL *et al.*, 2011).

2.2.8 O gene *IL28B* e o Mecanismo Patogênico

O gene *IL28B* localiza-se no cromossomo 19 (19q13), como demonstrado na Figura 2.



O traço vertical em vermelho identifica a posição do gene no cromossomo.

Figura 2 - Cromossomo 19
Fonte: GeneCards (2010, web)

Esse gene é composto de 5 éxons e 4 íntrons, como visualizado na Figura 3.



Figura 3 - Gene *IL28B*
Fonte: GeneCards (2010, web)

O gene *IL28B* codifica o interferon lambda 3 (IFN- λ -3), componente do tipo III de interferons (GE *et al.*, 2009). Os interferons são citocinas de classe II, caracterizados por seus efeitos antivirais celulares e classificados de acordo com seus receptores utilizados. Os interferons tipo I incluem interferon alfa (IFN- α), interferon beta (IFN- β) e outros subtipos, todos com via de sinalização por meio de receptores IFN- α/β . O tipo II de interferon inclui somente o interferon gama (IFN- γ) e

a sua via de sinalização é por meio de receptores de IFN- γ (PESTKA; KRAUSE e WALTER, 2004). Os interferons de tipo III incluem IFN- λ -1, λ -2 e λ -3, também conhecidos como IL29, IL28A e IL28B (DELLGREN *et al.*, 2009). Os IFN- λ s utilizam um receptor complexo composto de uma cadeia chamada IL-10R2 e outra chamada IL- λ R1 (KOTENKO *et al.*, 2003). Podem ser produzidos por vários tipos de células. Apesar do padrão de expressão não estar bem elucidado, relata-se que são mais produzidos por células dendríticas plasmocitóides (ANK *et al.*, 2006).

As classes de interferon tipos I e III apresentam determinadas atividades similares, induzindo proteção antiviral *in vitro* (KOTENKO *et al.*, 2003) bem como *in vivo* (ANK *et al.*, 2006). Apesar de suas ativações ocorrerem por meio de receptores complexos diferentes, suas sinalizações baseiam-se em processos intermediários idênticos por meio da via Jak-STAT (enzimas chamadas Janus-cinases – Jak1 e Tirosina cinase – Tyk2; e transdutores de sinal e ativadores da transcrição – STAT1 e STAT2). Dessa forma, ativam fatores de transcrição (*Interferon-Regulatory Factor* – IRF9, *Interferon-Stimulated Gene Factor* – ISGF3), que, por sua vez, conduzem a expressão de um conjunto de genes estimulados por interferon (*Interferon-Stimulated Genes* – ISGs) os quais, então, atuam mediando a atividade antiviral do IFN (KOTENKO *et al.*, 2003; SOMMEREYNS *et al.*, 2008).

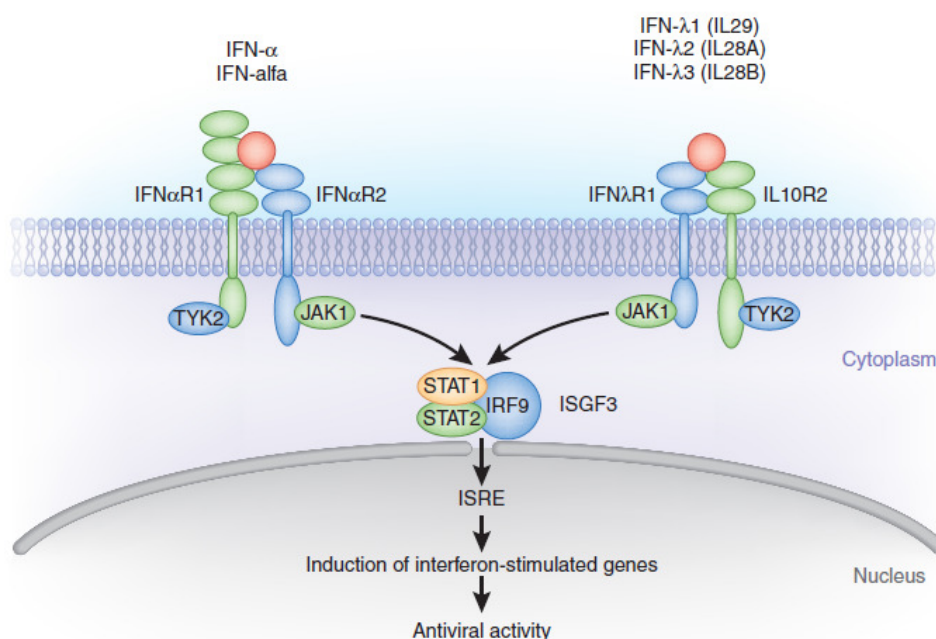


Figura 4 - Via de sinalização Jak-STAT
 Fonte: O'Brien (2009).

Os mecanismos por meio dos quais os polimorfismos próximos ao gene *IL28B* influenciam na resposta antiviral ao PegIFN e RBV permanecem controversos (THOMPSON *et al.*, 2010). Vários relatos têm mostrado que os IFN-λs exibem atividade antiviral contra diversos vírus, e, entre eles o HCV (LI *et al.*, 2009). Como já descrito, os interferons endógenos combatem as infecções virais, ativando várias vias de sinalização que controlam a replicação viral intracelular e uma das vias mais conhecidas é representada pelos ISGs. Atualmente, há evidências cada vez mais consolidadas sobre a relação entre a pré-ativação desse conjunto de genes e a falta de resposta à terapia à base de IFN (GARCIA *et al.*, 2011; SARAZIN-FILIPOWICZ *et al.*, 2008). Dessa forma, uma hipótese é a possibilidade de os polimorfismos relacionados ao gene *IL28B* modularem, pelo menos em parte, a resposta endógena dos ISGs (GARCIA *et al.*, 2011).

Sabe-se que o IFN-λ induz um aumento estacionário na expressão do subconjunto de ISGs, enquanto o IFN-α induz os mesmos genes com cinética mais

rápida e transitória (MARCELLO *et al.*, 2006). Por isso, é possível que o INF- λ induza uma resposta mais baixa, porém mais sustentada de proteção antiviral. Essa pode ser uma das explicações pela qual a variação genética influencia a expressão regular de *IL28B* em resposta ao tratamento com PegIFN- α /RBV (TANAKA *et al.*, 2009).

2.3 Métodos de Análise de SNPs

As metodologias para genotipagem de SNPs têm se desenvolvido muito nos últimos anos (CARVALHO, 2007) em razão da utilização crescente desses marcadores genéticos no mapeamento de doenças complexas, como câncer, diabetes e distúrbios mentais; determinação de suscetibilidades; contribuição na geração de mapas genéticos densos (KIM e MISRA, 2007) e aplicabilidade na genética forense (SOBRINO; BRIÓN e CARRACEBO, 2005). Em farmacogenética o principal objetivo de estudar esses polimorfismos é auxiliar a compreensão das diferenças individuais em resposta a drogas e permitir, então, a otimização do tratamento por meio da personalização terapêutica (KIM e MISRA, 2007; METZGER; SOUZA-COSTA e TANUS-SANTOS, 2006).

Em virtude disso, há hoje uma variedade de protocolos para a caracterização de SNPs (CARVALHO, 2007). A maioria deles baseia-se na obtenção e separação de produtos da PCR com especificidade alélica e, na sequência, definição do genótipo (REGINATO e VENERONI, 2009).

A maioria dos ensaios de genotipagem de SNPs pertence a um dos quatro grupos de classificação com base no mecanismo molecular: hibridização alelo-específica, extensão de *primers*, ligação de oligonucleotídeos e clivagem enzimática. Após a realização das reações de discriminação alélica, os produtos podem ser identificados e analisados com base em sua fluorescência, luminescência, massa, entre outros. Em relação ao formato do ensaio, existem duas categorias diferentes: reação homogênea, quando ocorre em solução, e reação em suporte sólido, quando se dá em lâmina de vidro, chip, etc (SOBRINO; BRIÓN e CARRACEBO, 2005).

Hibridização: utilizam-se sondas (segmento de ácido nucleico marcado) alelo-específicas para parear com a sequência alvo, a fim de alcançar a discriminação alélica. A técnica baseia-se nas diferenças de estabilidade térmica do DNA de dupla fita para distinguir entre pares de sonda/DNA-alvo perfeitos e imperfeitos. Dessa forma, a hibridização completa somente ocorre entre sonda e DNA-alvo com pareamento perfeito. Em ótimas condições de ensaio, a incompatibilidade em uma única base é suficiente e desestabiliza a hibridização. A efetividade na diferenciação do alelo depende do comprimento e sequência das sondas, da localização do SNP na sonda e das condições de hibridização. Uma ferramenta que utiliza esse princípio é o ensaio de genotipagem de SNP TaqMan[®] (Applied Biosystems, CA) que combina a hibridização e a atividade exonucleásica 5' da DNA polimerase acoplada à detecção de fluorescência (KIM e MISRA, 2007; KWOK, 2001).

Extensão de *primers*: envolve a incorporação alelo-específica de nucleotídeos complementares à sequência do DNA-alvo (KIM e MISRA, 2007). Há muitas variações dessa tecnologia e, segundo Kwok (2001) e Kim e Misra (2007), elas podem ser agrupadas em duas categorias. A primeira é uma adaptação do sequenciamento, utilizando-se dideoxynucleosídeos trifosfatos (*dideoxynucleotide*

triphosphates – ddNTPs) e um *primer* comum para a amplificação de ambos os alelos (exemplos: SNPstream™; Multiplex minisequencing, SNaPshot®; MassEXTEND™, MassArray™; GOOD assay; Microarray minisequencing, APEX). A segunda categoria consiste em uma PCR alelo-específica, em que a enzima DNA polimerase promove a amplificação do DNA somente se os *primers* forem perfeitamente complementares ao sítio referido do DNA-alvo, utilizando-se *primers* específicos para a detecção de cada alelo (exemplos: ARMS – *Amplification Refractory Mutation System*; ASPCR – *Allele Specific PCR*; PASA – *PCR Amplification of Specific Alleles*). Nas duas categorias, o nucleotídeo polimórfico pode ser revelado de acordo com sua massa ou fluorescência.

Ligação: neste grupo, empregam-se enzimas ligases para alcançar a discriminação alélica. Em um ensaio de ligação tradicional, três oligonucleotídeos são utilizados, dois deles são alelo-específicos e ligam-se ao DNA molde no sítio do SNP e o terceiro, comum, liga-se próximo à sonda alelo-específica, adjacientemente ao SNP. Se a sonda alelo-específica se liga ao sítio do SNP com perfeição, a enzima DNA ligase promove a união desta com a sonda comum e os produtos da ligação são detectados por diferentes métodos para, então, revelar a base na posição do SNP (exemplos: *Combinatorial Fluorescence Energy Transfer* – CFET e *Padlock Technology*) (KIM e MISRA, 2007).

Clivagem enzimática: baseia-se na capacidade de certas enzimas em clivar o DNA pelo reconhecimento de estruturas e sequências específicas. Quando o SNP está localizado na sequência de reconhecimento da enzima e as diferenças dos alelos afetam o reconhecimento, tais enzimas podem ser utilizadas para discriminação alélica. As enzimas de restrição são utilizadas para a detecção de variações genéticas pela análise de Polimorfismo de Comprimentos dos Fragmentos

de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP). Dessa forma, as enzimas reconhecem sequências específicas no DNA dupla fita e clivam ambas as vertentes em um determinado local, gerando fragmentos mais curtos. Para genotipar um SNP localizado em um sítio de restrição enzimática, os produtos da PCR que contêm o SNP são incubados com a enzima adequada. Após a incubação, os produtos da digestão são submetidos à eletroforese em gel e a determinação do genótipo é realizada a partir da análise dos tamanhos dos fragmentos (KIM e MISRA, 2007).

Dessa forma, a maioria das metodologias para a análise de SNPs baseia-se primariamente na obtenção e separação de produtos da PCR. As técnicas atualmente mais utilizadas para a genotipagem de SNPs são: PCR-RFLP, PCR em Tempo Real e sequenciamento.

2.4 Técnicas Utilizadas para Genotipagem de SNPs

2.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR)

A PCR é um método para a amplificação *in vitro* de sequências de DNA. A PCR foi desenvolvida, no início de 1980, por Kary Mullis, a quem foi concedido, em 1993, o prêmio Nobel de Química pela invenção. A técnica envolve ciclos automatizados de desnaturação, anelamento e extensão, utilizando um

termociclador, permitindo a detecção e análise de ínfimas quantidades de ácidos nucléicos (BARTLETT e STIRLING, 2003).

A técnica de PCR requer basicamente: a amostra de DNA a ser analisada; dois pares de oligonucleotídeos (construídos para delimitar a região da sequência nucleotídica do DNA a ser amplificada); a enzima DNA polimerase termoestável; o cofator enzimático cloreto de magnésio e os deoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs) para serem incorporados a nova fita de DNA sintetizada (EVANS, 2009; SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

No primeiro passo, de desnaturação, o DNA dupla fita é separado em duas fitas simples por aquecimento da amostra a 94 – 98°C. O próximo passo, de anelamento, tem como objetivo hibridizar iniciadores de oligonucleotídeos (*primers forward e reverse*) para se complementarem à sequência alvo. A temperatura de anelamento (TA) depende da composição de nucleotídeos dos *primers* e do seu comprimento e é, normalmente estabelecida, na faixa de 40 – 60°C. Em seguida, durante o passo de extensão, a 70 – 72°C, o *primer* anelado ao DNA-alvo é reconhecido pela enzima DNA polimerase que, então, a partir dele, sintetiza uma nova fita de DNA complementar (Figura 5) (EVANS, 2009).

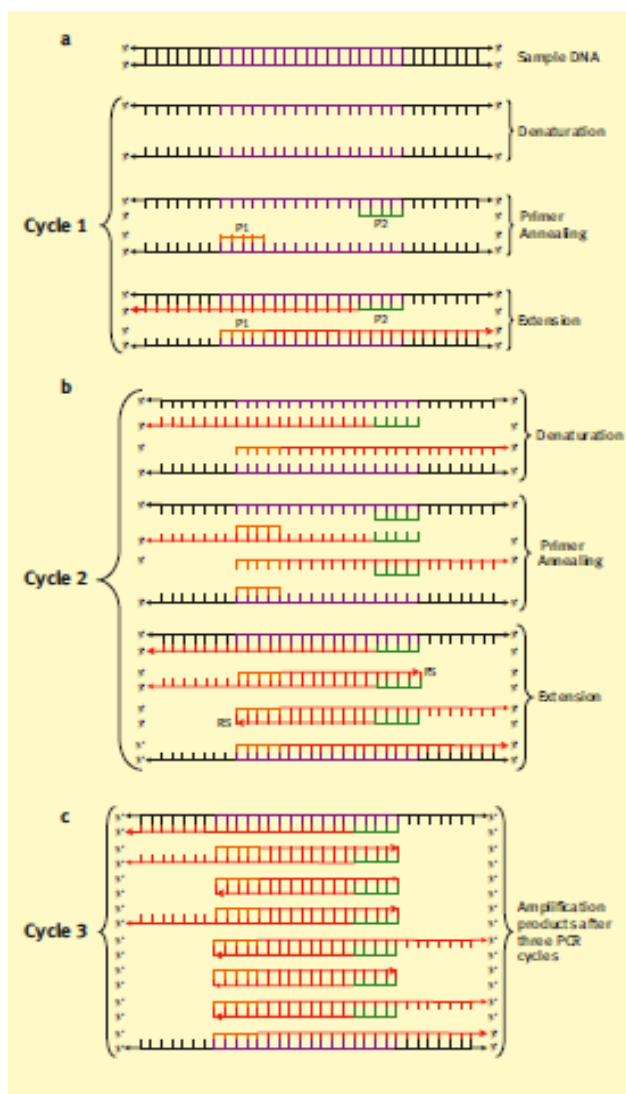


Figura 5 - Representação esquemática da PCR. a) A amostra de DNA é desnaturada por aquecimento. Durante o passo de anelamento, o *primer forward* (P1) e o *primer reverse* (P2) ligam-se à sequência alvo. No passo de extensão, o DNA é sintetizado por uma enzima DNA polimerase termoestável na direção 5' - 3' (setas laranjas). b) O segundo ciclo da PCR rende uma fita forward (FS) e uma fita reverse (RS) de DNA complementar, idêntica em composição e em comprimento à sequência alvo. c) *Amplicons* dupla-fitas equivalentes ao alvo são gerados depois do terceiro ciclo da PCR e são disponíveis para ampliações em rodadas subsequentes da PCR.
Fonte: Evans (2009).

O resultado da PCR (a amplificação do DNA) é obtido após ciclos repetidos de desnaturação, anelamento e extensão e o número de ciclos geralmente varia de 30 a 50. O período de tempo para cada passo pode variar de 10 segundos a mais de um minuto e depende de alguns fatores como o volume de reação, a composição de bases e comprimento dos *amplicons* (produto da PCR), a atividade da DNA polimerase e as especificações do equipamento termociclador (EVANS, 2009).

2.4.1.1 Componentes da PCR

Os componentes usuais da PCR são:

- a) Amostra de DNA: contém a sequência gênica a ser estudada, a qual será amplificada na PCR. O DNA pode ser adicionado na forma de fita simples ou fita dupla (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).
- b) Tampão de reação: tipicamente, utiliza-se o tampão enzimático Tris-HCl. O pH é ajustado entre 8,3 – 8,8 em temperatura ambiente. Em altas temperaturas, o pH cai aproximadamente em uma unidade, o que favorece a atividade da DNA polimerase (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).
- c) Cátions divalentes: as DNA polimerases termoestáveis requerem um cátion divalente, como o íon magnésio (Mg^{2+}), para sua atividade enzimática. O Mg^{2+} é um ingrediente essencial por estabilizar a interação entre o *primer*, o DNA molde e a enzima DNA polimerase (EVANS, 2009).
- d) Deoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs): são as unidades de construção básicas do DNA (2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP), 2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato (dGTP), 2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (dCTP) e 2'-deoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP)) (EVANS, 2009).
- e) Oligonucleotídeos: são segmentos de DNA complementares às extremidades do DNA selecionado para a amplificação (CAMPBELL e FARREL, 2007). A construção dos pares de oligonucleotídeos está entre os fatores que influenciam a eficiência e a especificidade da PCR, sendo determinante para garantir o sucesso ou a falha da reação (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

- f) DNA polimerase termoestável: enzima utilizada na síntese de DNA na PCR. Estável ao calor, a *Taq* DNA polimerase, extraída do microrganismo *Thermus aquaticus*, é a enzima mais comumente utilizada na PCR (BARTLETT e STIRLING, 2003; EVANS, 2009).
- g) Água pura: o volume final da reação de PCR varia de 10 – 50 µL e esses volumes são, então, definidos por ajuste no volume da água (EVANS, 2009).
- h) Aditivos: alguns reagentes podem ser adicionados à PCR para melhorar a eficiência da amplificação, como betaína (N, N, N trimetilglicina), dimetil sulfóxido (DMSO) ou glicerol. Esses reagentes facilitam a amplificação de regiões do DNA ricas em pares de bases G – C, promovendo a desestabilização da dupla fita de DNA e o anelamento específico dos *primers* (MCPERSON e MOLLER, 2006).

2.4.1.2 Otimização da PCR

Em geral, há experimentos que são necessários para padronizar e também para otimizar a eficiência de um ensaio de PCR. Potencialmente, cada componente da PCR pode ser manipulado para que seja melhorada a especificidade e a sensibilidade da reação (EVANS, 2009).

Amostra de DNA: a qualidade e a concentração de DNA molde podem afetar diretamente o resultado da amplificação. Usualmente, para a amplificação de DNA genômico, utilizam-se de 100 a 500 ng de DNA molde (BARTLETT e STIRLING, 2003).

Cátions divalentes: a concentração de magnésio é essencial para o sucesso da amplificação, pois pode afetar a atividade da DNA polimerase, a temperatura de desnaturação, o anelamento dos *primers* e favorecer a formação de dímeros de oligonucleotídeos (BARTLETT e STIRLING, 2003). A alta concentração de magnésio pode promover a sensibilidade do teste, mas pode reduzir a especificidade devido ao anelamento não específico dos *primers* às sequências não-alvo, resultando, assim, no aparecimento de múltiplos sinais no gel de agarose (EVANS, 2009), ao passo que as concentrações baixas de magnésio reduzem o rendimento dos produtos desejados da PCR (BARTLETT e STIRLING, 2003).

Deoxirribonucleosídeos trifosfatos (dNTPs): as concentrações de dNTPs podem afetar o rendimento e a especificidade da amplificação. Usualmente, concentrações de 20 a 200 μM são utilizadas para obter o sucesso na amplificação (BARTLETT e STIRLING, 2003).

Oligonucleotídeos: o desenho apropriado e a concentração adequada dos *primers* são fundamentais para o sucesso da amplificação (BARTLETT e STIRLING, 2003). Baixas concentrações de oligonucleotídeos podem favorecer a especificidade do teste, mas reduzem a sensibilidade. Já altas concentrações favorecem a sensibilidade e diminuem a especificidade (EVANS, 2009).

DNA polimerase termoestável: a concentração recomendada de DNA polimerase está entre 1 e 2,5 U por 100 μL de reação. Dependendo da sequência alvo e dos oligonucleotídeos, podem ser necessárias diferentes concentrações de enzima. Aumentando a quantidade de DNA polimerase, pode-se melhorar a eficiência da PCR, porém, aumentam, também, os produtos inespecíficos (BARTLETT e STIRLING, 2003).

Além da manipulação dos componentes da reação, faz-se necessário o ajuste na programação das fases da PCR.

Como descrito anteriormente, a PCR é uma reação composta de três fases:

1. desnaturação das fitas de ácido nucléico pelo calor;
2. anelamento dos oligonucleotídeos com a sequência de interesse; e
3. extensão dos oligonucleotídeos pela enzima DNA polimerase.

As três fases apresentam características próprias, como descritas a seguir:

a) Desnaturação: a temperatura necessária para a desnaturação da dupla fita de DNA é determinada parcialmente pela quantidade de guanina e citosina presente na molécula (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Um par de bases G – C possui três pontes de hidrogênio, enquanto um par de bases A – T possui apenas duas (CAMPBELL e FARREL, 2007). Sendo assim, quanto maior for a proporção de pares de bases G – C, maior será a temperatura e o tempo necessário para a desnaturação completa de uma molécula de DNA (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A desnaturação em PCRs catalisadas pela *Taq* DNA polimerase é realizada a 94 – 95 °C, correspondente a temperatura mais alta que a enzima pode suportar por 30 ou mais ciclos, sem sofrer danos. Para a amplificação de DNA linear contendo 55% ou menos de pares de bases G – C, o tempo de desnaturação recomendado é de 45 segundos (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

b) Anelamento dos oligonucleotídeos: a temperatura utilizada na fase de anelamento é extremamente crítica. Em baixas temperaturas, pode ocorrer o anelamento inespecífico dos *primers*, resultando na amplificação indesejada de segmentos de

DNA. Já em temperaturas altas, os *primers* hibridizam mal, havendo um baixo rendimento dos produtos amplificados (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A TA ótima para uma PCR em particular depende da composição nucleotídica (quantidade de C, G, A e T), do comprimento e da concentração dos *primers* (BARTLETT e STIRLING, 2003; SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Existem muitas fórmulas para determinar a temperatura de fusão (TM) teórica (utilizando-se a quantidade de nucleotídeos), mas nenhuma delas é precisa o suficiente para *primers* de diferentes comprimentos e sequências. O anelamento geralmente é realizado à 3 – 5°C abaixo da TM, na qual os pares de oligonucleotídeos se dissociam de seus moldes. Entretanto, na prática, a melhor maneira de padronizar a TA é com o uso da termociclagem em gradiente de temperatura. As temperaturas variam de 2 – 10°C abaixo do limite inferior da TM dos oligonucleotídeos (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Para a garantia de sucesso do anelamento, recomenda-se tempo de incubação de 30 segundos a 1 minuto (BARTLETT e STIRLING, 2003).

c) Extensão dos oligonucleotídeos: a temperatura de extensão equivale a uma temperatura próxima àquela requerida para a síntese catalítica do DNA pela DNA polimerase. Em se tratando de *Taq* DNA polimerase, essa temperatura varia entre 72 – 78°C. Nos primeiros dois ciclos, a extensão de um oligonucleotídeo continua até a sequência complementar encontrar o local do outro oligonucleotídeo. No próximo ciclo, as primeiras moléculas são produzidas com o tamanho molecular previsto pela delimitação dos oligonucleotídeos. Deste ciclo em diante a molécula é amplificada geometricamente e os produtos de amplificação são acumulados de forma aritmética (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Quando o produto da PCR tem até 2kb de comprimento, uma extensão com tempo de 1 minuto a 72°C é suficiente. Além disso, a etapa de extensão final de 5 – 10 minutos a 72°C pode ser adicionada

à reação com o objetivo de assegurar que todos os *amplicons* sejam completamente estendidos (BARTLETT e STIRLING, 2003).

d) Número de ciclos: o número de ciclos da PCR depende do número de cópias do DNA molde presente no início da reação, da eficiência da extensão dos oligonucleotídeos e da amplificação. A reação prossegue até um de seus componentes serem limitados, uma vez que é estabelecida a fase geométrica da amplificação. Normalmente, são empregados de 30 a 40 ciclos em uma reação de PCR (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A seguir, são listadas determinadas condições que podem conduzir à falha no sucesso da amplificação e as possíveis soluções recomendadas correspondentes.

Segundo Bartlett e Stirling (2003), se nenhum ou pouco produto desejado como resultado da PCR é detectado, alguns aspectos devem ser considerados:

- a) pouco DNA pode estar presente na reação. Deve-se aumentar a quantidade de DNA molde;
- b) o DNA molde pode estar danificado ou degradado. Garantir a pureza e integridade do DNA minimiza as falhas;
- c) baixa quantidade de DNA polimerase pode estar presente na reação. A quantidade de enzima deve ser aumentada em incrementos de 0,5 U por 100 μ L de reação;
- d) o número de ciclos pode ser insuficiente. Deve-se acrescentar 5 a 10 ciclos;
- e) a concentração de magnésio pode estar insuficiente. Orienta-se aumentar a concentração em incrementos de 0,1 mM;

- f) o tempo de desnaturação pode estar muito longo ou muito curto. Deve-se ajustar o tempo em variações de 5 segundos;
- g) a temperatura de desnaturação pode estar muito alta ou muito baixa. Orienta-se ajustar a temperatura em variações de 1 °C;
- h) a TA dos *primers* pode estar muito alta. Recomenda-se, assim, reduzir a temperatura em variações de 2 °C;
- i) o período de extensão dos *primers* pode estar muito curto. Deve-se aumentar o tempo de extensão em incrementos de 1 minuto.

Quando vários sinais ou manchas são detectados no gel após amplificação, deve-se considerar o seguinte (BARTLETT e STIRLING, 2003):

- a) a TA pode estar muito baixa. Deve-se aumentar a temperatura em intervalos de 2 °C;
- b) muito DNA molde pode estar presente na reação. Deve-se diminuir a quantidade de DNA molde;
- c) a concentração de DNA polimerase pode estar excessiva. Orienta-se diminuir a quantidade de enzima em variações de 0,5 U em 100 µL por reação;
- d) a concentração de magnésio pode estar muito alta. Deve-se diminuir a concentração de magnésio na reação em variações de 1 mM;
- e) o tempo de extensão pode estar muito longo. Orienta-se diminuir o tempo de extensão em variações de 1 minuto;
- f) o número de ciclos pode estar muito alto. Deve-se reduzir 5 a 10 ciclos.

2.4.2 Análise de Polimorfismo de Comprimentos dos Fragmentos de Restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP*)

O método mais básico para genotipagem de SNPs em determinadas regiões do genoma é baseado na técnica PCR-RFLP (CAETANO, 2009; MAEDA *et al.* 1989). A PCR-RFLP permite a detecção de mutações pontuais depois que a sequência genômica a ser estudada é amplificada por PCR. A mutação é discriminada por digestão com endonucleases (enzimas de restrição) específicas e é detectada por eletroforese em gel (Figura 6) (OTA *et al.*, 2007).

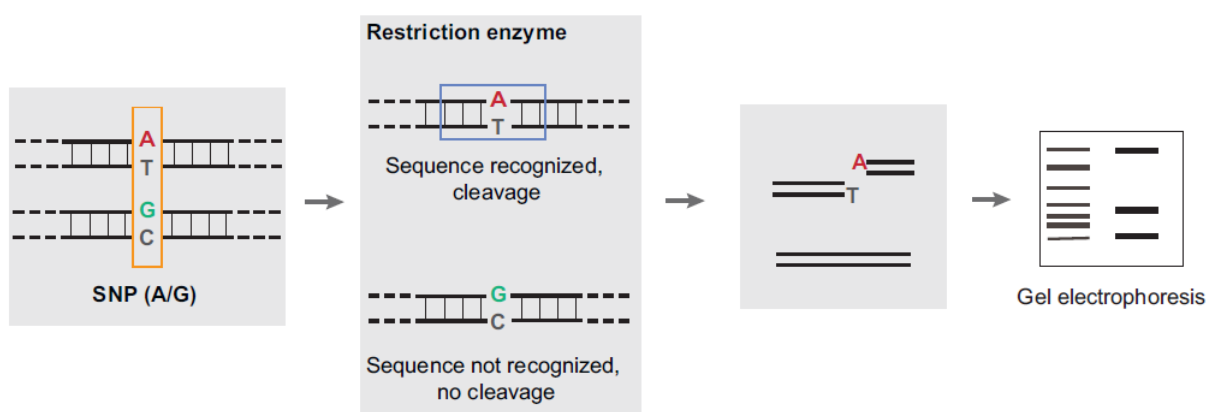


Figura 6 - Representação esquemática da discriminação alélica analisada via clivagem enzimática seguida de eletroforese em gel (RFLP)
Fonte: Kim e Misra (2007)

A PCR-RFLP é um procedimento simples, de baixo custo, preciso e rápido (OTA *et al.*, 2007). Além disso, é um método que não requer equipamentos avançados, necessitando apenas de um termociclador convencional e utensílios de eletroforese (CAETANO, 2009). É uma técnica vantajosa, porém, por vezes, pode fornecer resultados indeterminados (GUIRGIS; ABBAS e AZZAZY, 2010). Outra

desvantagem desse método é a necessidade de se ter uma enzima de restrição para diferenciar os dois alelos (mutante e selvagem), o que nem sempre é possível e, além disso, normalmente essa metodologia não permite ensaios paralelos, permitindo apenas a genotipagem de um locus por ensaio (CAETANO, 2009).

A eletroforese, necessária à RFLP, é uma técnica rápida, sensível e precisa, capaz de separar moléculas em função da sua massa (tamanho), forma e compactação (KOCH e ANDRADE, 2008). A molécula de DNA, por exemplo, migra em suportes (agarose ou acrilamida), aplicando-se uma corrente elétrica, com diferentes velocidades, dependendo do tamanho e forma da molécula em estudo. Como as moléculas de DNA são carregadas negativamente, quando são submetidas a um campo elétrico, migram para o polo positivo e, com a força oposta à migração, existe o atrito com o gel. Quanto maior a molécula, maior o atrito e, então, mais lenta a migração. Dessa forma, moléculas de tamanhos diferentes migrarão a uma distância diferente depois de algum tempo (KOCH e ANDRADE, 2008; VIEIRA, 2011, web). A distância que determinado fragmento percorre a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que fragmentos de tamanhos conhecidos (*Ladders* = escadas) percorrem no mesmo gel. Os marcadores de tamanho molecular (*Ladders*) são misturas de trechos de DNA com tamanhos variados, normalmente equidistantes entre si (KOCH e ANDRADE, 2008; VIEIRA, 2011, web).

A visualização do DNA após a corrida eletroforética ocorre na presença de compostos intercalantes, dos quais o mais utilizado é o brometo de etídio (EtBr) (ZAHA *et al.*, 2003). O EtBr tem a capacidade de inserir-se nas fendas da cadeia de DNA e, então, apresentar fluorescência após excitação com radiação ultravioleta. Adiciona-se EtBr (10 µg/mL) ainda no gel liquefeito antes da corrida ou pode-se levar

o suporte a uma solução de EtBr (10 µg/mL) e deixar descansar por alguns minutos (VIEIRA, 2011, web).

Existem duas matrizes sólidas mais utilizadas para eletroforese: géis de agarose e géis de acrilamida. As duas substâncias formam tramas de poros de tamanhos variados, possibilitando, assim, a separação dos fragmentos. A eficiência da separação depende da concentração do polímero e da intensidade da voltagem e amperagem aplicada (KOCH e ANDRADE, 2008; VIEIRA, 2011, web). Tanto a agarose como a acrilamida são dissolvidas numa solução-tampão eletrolítica. Essa solução é, obrigatoriamente, a mesma que recobrirá o gel na cuba de eletroforese e possibilitará a passagem da corrente elétrica (tampão de corrida). Para a eletroforese de DNA, usualmente se utilizam os tampões TBE (Tris/Borato/EDTA) e TAE (Tris/Acetato/EDTA) (KOCH e ANDRADE, 2008; VIEIRA, 2011, web). Para agarose, são utilizadas concentrações de 0,5 a 3% no gel. Quanto maior a concentração, maior é a capacidade de definição, ou seja, maior é a capacidade de distinguir fragmentos de tamanhos próximos. Já para acrilamida, normalmente se utilizam géis com concentrações de 4 a 25% (KOCH e ANDRADE, 2008; VIEIRA, 2011, web).

2.4.3 PCR em Tempo Real

Métodos de PCR em Tempo Real para prospecção e genotipagem de SNPs estão se tornando cada vez mais importantes no campo da ciência médica (GIBSON, 2006).

A PCR em Tempo Real utiliza sondas de hibridização marcadas com fluorocromos e uma plataforma de instrumentação que consiste em um termociclador com sistema óptico para capturar a emissão de fluorescência e um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reação (CARVALHO, 2007; NOVAIS e ALVES, 2004). As sondas são construídas para hibridizar perfeitamente com um alelo específico em um determinado locus, porém, de forma incompleta com outro alelo (HIRATA; TAVARES e HIRATA, 2006). A emissão de fluorescência gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Durante cada ciclo, os valores de fluorescência são gravados e representam, ao final, a totalidade do produto amplificado (NOVAIS e ALVES, 2004). Assim, a PCR em Tempo Real permite, em um sistema fechado, a amplificação e a detecção de forma simultânea. Para isso, é necessário um termociclador que possua sistema de monitoramento de emissão de fluorescência (MOLINA e TOBO, 2004).

No sistema TaqMan[®], utilizam-se quatro oligonucleotídeos: duas sondas alelo-específicas e um par de *primers* que flanqueia a região contendo o SNP. As sondas de DNA são marcadas com compostos fluorescentes nas extremidades 5' e 3' denominados *reporter* (marcador) e *quencher* (bloqueador), respectivamente (as sondas intactas não apresentam fluorescência). Durante a PCR, na fase de pareamento, as sondas TaqMan[®] hibridizam com a sua cadeia complementar. Na fase de extensão, a enzima DNA polimerase somente cliva a sonda hibridizada que é perfeitamente compatível, liberando o fluorocromo *reporter*, gerando sinal de fluorescência. Como resultado, ambos os alelos podem ser detectados durante a reação com base na hibridização de sondas específicas (Figura 7) (KIM e MISRA, 2007).

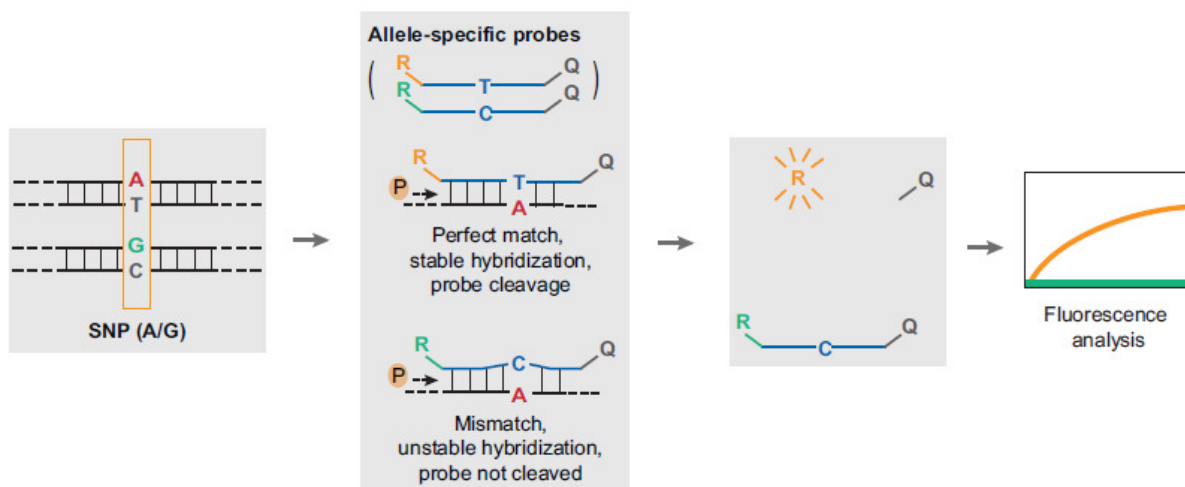


Figura 7 - Representação esquemática do_Ensaio TaqMan®
 Fonte: Kim e Misra (2007)

A PCR em Tempo Real apresenta muitas vantagens como, grande sensibilidade, alto rendimento, velocidade de análise, controle de qualidade no processo e baixo risco de contaminação, porém requer uma aparelhagem mais sofisticada e de custo superior ao PCR convencional (GUIRGIS; ABBAS e AZZAZY, 2010; NOVAIS e ALVES, 2004).

2.4.4 Sequenciamento

O avanço tecnológico para genotipagem de SNPs despontou com metodologias que utilizam sequenciadores automáticos (CAETANO, 2009). O sequenciamento automático é a técnica mais utilizada para a determinação da ordem exata dos nucleotídeos em um segmento de DNA. Essa técnica foi baseada

no método desenvolvido, em 1979, por Sanger-Coulson, também conhecido como método de terminação de cadeia (LIMA, 2008).

Na presença de um *primer* específico, há a síntese de uma fita complementar ao DNA molde. A partir da extremidade 3' do *primer*, são incorporados dNTPs e ddNTPs. Estes últimos, ao contrário dos dNTPs, não possuem o radical hidroxila no carbono 3 da desoxirribose. A inexistência da hidroxila nesse sítio não permite que a DNA polimerase continue incorporando nucleotídeos à fita molde. A relação entre as concentrações de dNTPs e ddNTPs na reação faz com que ocorram interrupções de síntese em todas as posições correspondentes do DNA molde. Dessa forma, têm-se, ao fim da reação, moléculas complementares interrompidas em todas as posições possíveis (FERREIRA e ROCHA, 2004).

Devido à utilização de um fluorocromo diferente para cada ddNTP, a eletroforese é realizada em um único canal do gel de sequenciamento. À medida que os segmentos de DNA passam pelo feixe de laser, os fluorocromos são excitados e emitem luz, em diferentes comprimentos de onda que, então, é detectada por um fotomultiplicador. A informação é traduzida na forma de sequência nucleotídica por meio de um sistema computadorizado e, em seguida, é apresentada no eletroferograma (LIMA, 2008).

O sequenciamento de DNA é considerado o padrão ouro para detecção de mutações (FERREIRA e ROCHA, 2004; MOLINA e TOBO, 2004). Essa técnica permite a genotipagem de mais de um SNP em um mesmo fragmento, ou em fragmentos diferentes, e é possível genotipar até 10 SNPs em um único ensaio (CAETANO, 2009). É considerada a técnica mais confiável, porém exige alta habilidade de execução e suporte, além da necessidade de equipamentos custosos (GUIRGIS; ABBAS e AZZAZY, 2010). Embora seja uma metodologia avançada,

apresenta como limitação a análise de fragmentos ao redor de 500 – 800 pares de bases (pb). Por isso, não é adequada para detecção de mutações em regiões maiores que 1kb (FERREIRA e ROCHA, 2004).

2.5 Bioinformática

Por volta da década de 90, com o surgimento dos sequenciadores automáticos de DNA, houve um aumento na quantidade de sequências a serem armazenadas, exigindo recursos computacionais mais eficientes. Além disso, houve também a necessidade de análise dos dados gerados, tornando indispensável a utilização de programas computacionais para a interpretação dos resultados obtidos (PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

A bioinformática, atualmente, é imprescindível para a manipulação dos dados biológicos. Essa nova ciência abrange todos os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica (SANTOS e ORTEGA, 2010, web). Combina diversas linhas de conhecimento, como: engenharia de softwares, matemática, estatística, ciência computacional e biologia molecular (PROSDOCIMI *et al.*, 2003).

Em consequência da quantidade de informações que são produzidas, fez-se necessário organizá-las de maneira acessível. A construção de bancos de dados para o armazenamento dessas informações (sequências de DNA e genomas inteiros, proteínas e suas estruturas tridimensionais, bem como outros produtos) é extremamente importante (SANTOS e ORTEGA, 2010, web).

O Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos EUA (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI) é o banco central de dados sobre informações genômicas mais reconhecido. O GenBank é o principal banco de dados do NCBI e armazena todas as sequências publicamente disponíveis de DNA, RNA e proteínas (SANTOS e ORTEGA, 2010, web).

Algumas ferramentas foram desenvolvidas pela bioinformática para permitirem o acesso e a análise dos dados disponíveis no GenBank. Uma ferramenta que permite a comparação de sequências de DNA com os bancos de dados genômicos é o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST[®]). Por meio desse algoritmo, pode-se comparar uma sequência qualquer de DNA com todas as sequências genômicas dispostas em domínio público (SANTOS e ORTEGA, 2010, web).

O NCBI possui um banco de dados de SNPs de diferentes organismos, sendo que, na espécie humana, há milhões já catalogados. A partir dessa coleção, juntamente com métodos moleculares e ferramentas em bioinformática, pode-se estudar a associação entre os distintos alelos e suas características relacionadas (SANTOS e ORTEGA, 2010, web).

2.5.1 Planejamento de Oligonucleotídeos.

Atualmente são disponibilizados programas computacionais que permitem a elaboração de oligonucleotídeos. Os mais populares softwares de análise de oligonucleotídeos são: Fast PCR (KALENDAR; LEE e SCHULMAN, 2009), Oligo

(2011, web), *Primer 3* (ROZEN e SKALETSKY, 2010, web), Visual OMP (SANTA LUCIA, 2007) e Vector (Invitrogen Corp.).

O desenho apropriado e o uso de concentração adequada dos *primers* são fundamentais para uma PCR bem sucedida (BARTLETT e STIRLING, 2003). As condições termodinâmicas que serão estabelecidas durante a reação dependem diretamente do planejamento dos oligonucleotídeos (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A construção desses *primers* é baseada em fatores que influenciam a reação de PCR, tais como a composição de bases, o comprimento e a *T_m* do *primer*, entre outros aspectos.

a) Composição de bases: o conteúdo de bases G e C deve estar entre 40 a 60% do total de nucleotídeos (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Os dois oligonucleotídeos devem apresentar quantidades semelhantes de bases G e C, de forma que apresentem *T_m*s similares (CAMPBELL e FARREL, 2007).

b) Comprimento: a sequência do oligonucleotídeo, complementar ao DNA molde, deve variar entre 18 a 25 nucleotídeos. Entre os *primers* não deve haver diferença superior a três nucleotídeos (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Os *primers* devem ser longos o suficiente para serem específicos à sequência-alvo, mas não tão longos a ponto de serem dispendiosos (CAMPBELL e FARREL, 2007).

c) Sequências repetidas e autocomplementares: essas sequências tendem a formar estruturas moleculares chamadas *hairpins* (grampos), que, por sua vez, podem impedir que os oligonucleotídeos hibridizem com o DNA alvo (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). *Hairpin* é uma estrutura formada por uma única molécula de DNA, na qual uma parte da molécula hibridiza com uma parcela complementar da da

mesma fita de DNA, formando uma estrutura semelhante a um grampo (BARTLETT e STIRLING, 2003).

d) Complementaridade entre os oligonucleotídeos: a sequência terminal 3' de um oligonucleotídeo não pode ser apta a ligar-se com qualquer sítio do outro oligonucleotídeo. Caso isso aconteça, devido à alta concentração de *primers* na PCR, qualquer complementaridade pode ser formada, resultando em dímeros. Assim, se dímeros são formados no início da reação, podem competir com os outros componentes da PCR, como a enzima DNA polimerase, os próprios *primers* e os nucleotídeos e, então, suprimir a amplificação (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

e) Temperatura de fusão (TM): a TM entre os pares de oligonucleotídeos não deve diferir mais de 5°C (BARTLETT e STIRLING, 2003).

f) Porção terminal 3': a natureza da porção terminal 3' do oligonucleotídeo é fundamental para a hibridização dos *primers*. Recomenda-se, preferencialmente, que a última base dessa região seja G ou C. Não deverá ser GC ou CG devido ao alto valor de ΔG , o que favorece o aparecimento de estruturas *hairpins* e dímeros (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

2.5.2 Bases de Dados para a Determinação de Endonucleases

Há algum tempo, tem-se disponível, gratuitamente e em constante atualização, bases de dados com determinadas endonucleases capazes de clivar sequências pretendidas de DNA.

O banco de dados de enzimas de restrição, REBASE (<http://www.neb.com/rebase>) é uma coleção de informações sobre as enzimas de restrição, tais como os microrganismos a partir dos quais foram isoladas, as sequências de reconhecimento, a localização dos sítios de clivagem, a disponibilidade comercial, entre outros dados (ROBERTS *et al.*, 2010, web).

O NEBcutter (<http://www.tools.neb.com/NEBcutter>) é um programa capaz de aceitar, como entrada, uma sequência de DNA, e produzir um relatório detalhado das enzimas de restrição que irão clivar naquela sequência. Esse programa produz uma variedade de informações, incluindo mapas de restrição enzimática, digestões teóricas e interface para o banco de dados REBASE (VINCZE; POSFAI e ROBERTS, 2010, web).

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo e Método de Pesquisa

Pesquisa experimental, indutiva, utilizando-se variáveis dependentes manipuladas pelo pesquisador.

3.2 Considerações Éticas e Proveniência das Amostras

As amostras de DNA foram obtidas de um estudo obtido anteriormente, denominado “Prevalência do polimorfismo do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) na população de Joinville”, realizado pela pesquisadora Gabriela Ronconi Gastal, acadêmica do programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, no período de 2009 a 2010. Esse projeto, protocolado sob o número 134/09, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVILLE em 11/11/2009, tendo recebido o parecer 326/2009/CEP. Nesse estudo, os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em que se solicitava a autorização para armazenamento de seus dados e amostra de DNA por 5 anos, para investigação futura de outras regiões do seu genoma. Esclareceu-se que nenhuma outra pesquisa seria realizada sem que o indivíduo fosse contatado, informado e autorizasse, novamente, por meio

de consentimento escrito. Sendo assim, o material somente seria utilizado se o indivíduo assinasse o TCLE (Apêndice A) do novo projeto, após a aprovação deste pelo CEP. Dessa forma, os indivíduos foram contatados por telefone e todos os que concordaram em participar da nova pesquisa foram procurados pessoalmente para assinar o TCLE. O TCLE foi redigido e assinado em duas vias: uma foi entregue aos participantes da pesquisa e a outra ficou de posse da pesquisadora.

As amostras foram incluídas na pesquisa de acordo com a sequência numérica de registro do estudo anterior, dependendo do consentimento de cada indivíduo. As amostras de sangue desse estudo anterior foram coletadas no Hemocentro da cidade de Joinville/Santa Catarina (Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC) no período de fevereiro a abril de 2010. De cada sujeito, doador voluntário de sangue, foram aproveitados cerca de 5 mL do volume residual de sangue periférico utilizado na rotina das investigações do Hemocentro, coletados em tubo com anticoagulante EDTA. A extração do DNA genômico foi realizada empregando-se o kit "Qiamp DNA Mini Kit" (Qiagen), conforme instruções do fabricante (Anexo A).

3.3 População-Alvo

O presente trabalho não visou uma população alvo específica. As amostras foram utilizadas apenas para testes da ferramenta molecular desenvolvida. Esta pesquisa teve como critério de inclusão, a disponibilidade de amostras de DNA obtidas de um estudo anterior, como já descrito.

3.4 Quantidade de Amostras

A quantidade de amostras analisadas foi baseada na frequência de cada genótipo dos dois polimorfismos descritos. Considerando-se a menor frequência genotípica do genótipo mais raro, GG, do polimorfismo rs8099917, verificada no NCBI (2010, web) (6,7%⁵), o número mínimo estimado de amostras analisadas para se encontrar um caso correspondente a esse genótipo foi de 15 amostras. Portanto, foi definido analisar-se 5 vezes mais amostras (total de 75 amostras) do que o mínimo necessário, a fim de aumentar a garantia de reprodutibilidade.

3.5 Procedimentos Metodológicos

Para o desenvolvimento de um sistema original simplificado para a análise de polimorfismos próximos ao gene *IL28B*, foram cumpridas etapas a seguir.

3.5.1 Bioinformática

3.5.1.1 Aquisição de Sequências Nucleotídicas

De acordo com quatro publicações, Ge *et al.* (2009), Tanaka *et al.* (2009), Thomas *et al.* (2009) e Suppiah *et al.* (2009), os polimorfismos analisados, rs12979860 e rs8099917, encontram-se próximos ao gene *IL28B*, no cromossomo humano 19.

Primeiramente, analisaram-se, por meio do banco de dados genômico virtual Entrez SNP (NCBI, 2010, web) e dos bancos de dados interligados *Basic Local Alignment Tool* (BLAT) (KENT *et al.*, 2010, web) e BLAST[®] (ALTSCHUL *et al.*, 1997), os dados obtidos por revisão bibliográfica e a verificação da viabilidade de estudos nessa região genômica. Assim, adquiriu-se a localização e a sequência nucleotídica dos polimorfismos e do gene *IL28B*. Utilizando essas informações, foi obtido o mapa gênico da região de interesse no Genbank (NCBI, 2010, web).

3.5.1.2 Pesquisa de Endonucleases

Após a análise acima descrita, as sequências nucleotídicas que contêm as regiões polimórficas foram submetidas à ferramenta *online* NEBcutter (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2010, web) que verifica a existência de possíveis endonucleases que poderiam reconhecer a posição polimórfica de interesse, ou seja, a distinção de uma das formas variantes: rs12979860 (C/T) e rs8099917 (T/G). Também nesta fase, avaliou-se a possibilidade da enzima selecionada clivar em mais de um sítio na determinada região gênica. Além disso, na ferramenta virtual REBASE (ROBERTS *et al.*, 2010, web) simulou-se a digestão enzimática dos seguimentos gênicos e os possíveis fragmentos resultantes.

3.5.1.3 Elaboração de Oligonucleotídeos

O próximo passo foi o planejamento, análise e definição dos oligonucleotídeos. Para isso, empregou-se a ferramenta *online Primer 3* (ROZEN e SKALETSKY, 2010, web).

O planejamento dos *primers* foi baseado em alguns fatores que influenciam a reação de PCR. Considerando-se os limites recomendáveis, estabeleceu-se: conteúdo de bases G e C entre 40 – 60% do total de nucleotídeos; comprimento dos *primers* entre 18 a 25 nucleotídeos e diferença entre TMs não superior a 5°C.

Após serem determinados os *primers*, cada um deles foi submetido ao software BLAST[®] (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para verificação de possíveis alinhamentos com sequências homólogas disponíveis no banco de dados Genbank. Os oligonucleotídeos foram analisados, primeiramente, mediante todas as sequências disponíveis no banco, sem especificar qualquer organismo e, para uma análise mais refinada, foram também avaliados mediante organismos específicos, como *Homo sapiens* (para verificação de alinhamento com outras sequências nucleotídicas humanas), *Staphylococcus epidermidis* (devido possíveis contaminações da amostra em estudo com esse organismo), HCV, vírus da hepatite B e HIV (os dois últimos devido à possibilidade de coinfeção com o HCV).

3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Padronizou-se uma metodologia de PCR para a amplificação dos segmentos gênicos contendo os dois polimorfismos em questão. A padronização da técnica foi realizada mediante testes de concentração de oligonucleotídeos e DMSO e temperatura de anelamento. A termociclagem foi conduzida em aparelho XP Thermal Cycler (BIOER Technology Co, Tóquio, Japão).

A PCR foi realizada em um volume estabelecido de 50 μ L, composto de 50 a 500 ng de DNA, 1U de *Taq* DNA polimerase (Platinum[®]*Taq* DNA Polymerase, Invitrogen, São Paulo, Brasil), 200 μ M de dNTPs (GE, Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 1 – 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1X PCR Buffer (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 10 – 50 pmol de cada *primer* (Eurofins MWG Operon, Huntsville, USA).

Para confirmar a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese submersa em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA), em gel de agarose a 1% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo. O gel foi exposto à luz ultravioleta em um aparelho transiluminador e o registro foi digitalizado em sistema de fotodocumentação (MiniBis-Pro Photodocumentation System – DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalém, Israel).

A primeira PCR realizada teve como condição de reação, para os dois SNPs, uma pré-incubação por 3 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos incluindo três passos: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Para a determinação de uma TA ótima e comum aos dois pares de *primers*

(referentes aos polimorfismos em estudo), as reações foram testadas em gradientes de temperatura, variando de 55°C a 65°C (especificamente, 57°C; 59,1°C; 60,5°C; 62,6°C e 65,1°C), de acordo com a disposição dos tubos no termociclador.

Após, foram realizados testes empregando-se 5 a 10% de DMSO (Amresco, Ohio, EUA) somente para o sistema que amplifica o segmento de DNA contendo o polimorfismo rs12979860.

3.5.3 Análise de Polimorfismo de Comprimentos dos Fragmentos de Restrição

Depois de o material ser amplificado, utilizou-se a técnica RFLP para a análise dos polimorfismos. Os polimorfismos foram analisados em separado, sendo definida uma endonuclease para cada. Os *amplicons* e as enzimas de restrição foram submetidos à digestão durante 2 h, conforme condições descritas pelo fabricante (Anexos B e C).

Para o reconhecimento de uma das formas variantes do polimorfismo rs12979860 (C/T), os *amplicons* foram submetidos à digestão enzimática pela endonuclease *Hpy166II* (New England Biolabs, Beverly, EUA). A reação foi realizada a 37°C em um volume estabelecido de 20 µL. Para 10 µL de *amplicons*, utilizou-se 1 U da endonuclease e quantidade de tampão recomendada pelo fabricante.

Para o reconhecimento de uma das formas variantes do outro polimorfismo, rs8099917 (T/G), os *amplicons* foram submetidos à digestão enzimática pela endonuclease *BsrDI* (New England Biolabs, Beverly, EUA). A reação foi realizada a 65°C em um volume estabelecido de 20 µL. Para 10 µL de *amplicon* utilizou-se 1U

da endonuclease e quantidade de tampão e albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin* – BSA) recomendada pelo fabricante.

Os produtos das digestões foram submetidos à eletroforese, testando-se a porcentagem de agarose (variando de 1 a 3%) no gel, tempo de duração da corrida eletroforética (a partir de 45 minutos, foram digitalizadas as fotos de 15 em 15 minutos para verificar o tempo em que melhor se visualizaria a separação dos fragmentos) e voltagem da corrente elétrica. Nesse passo, observa-se, pelo perfil eletroforético, o genótipo de cada indivíduo: homocigoto ou heterocigoto.

3.5.4 Sequenciamento

Para a validação da metodologia proposta, algumas amostras representativas de cada genótipo de ambos os SNPs em estudo foram submetidas à técnica de sequenciamento de DNA. Os amplicons selecionados foram submetidos ao sequenciamento bidirecional direto, com emprego do kit Big Dye[®] Terminator v3.1 e instrumento ABI Prism[™] 377 DNA *Sequencer* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). As sequências foram analisadas por meio do software ClustalW (THOMPSON; HIGGINS e GIBSON, 1994), disponível no pacote de programas BioEdit 7.0.9 (HALL, 1999).

3.6 Local de Pesquisa

Os procedimentos metodológicos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE. A técnica de sequenciamento foi realizada no Laboratório Genomic Ltda. em São Paulo/SP. As amostras foram enviadas sob codificação, conferindo absoluto sigilo quanto à identificação do sujeito da pesquisa. A quantidade de material enviada foi apenas a suficiente para a realização do procedimento, não havendo sobras de material.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, esse capítulo será apresentado na forma de artigo científico que será encaminhado para publicação em periódicos.

A straightforward genotyping of the relevant *IL28B* SNPs for the prediction of hepatitis C treatment outcome

Simone Moreira^{a,*}, Raquel Francine Liermann Garcia^a, Andréia Gutberlet^a, Bruna Cristina Bertol^a, Leslie Ecker Ferreira^a, Mauro de Souza Leite Pinho^a, Paulo Henrique Condeixa de França^a

^a Department of Medicine of Universidade da Região de Joinville
Address: Paulo Malschitzki, 10, Campus Universitário, Zona Industrial. Zip Code: 89219-710.
Joinville, Santa Catarina, Brazil.

* Corresponding author
Department of Medicine.
Universidade da Região de Joinville.
Address: Paulo Malschitzki, 10, Campus Universitário, Zona Industrial. Zip Code: 89219-710.
Joinville, Santa Catarina, Brazil.
Tel.: +55 47 34619197
Fax: +55 47 34730131
e-mail: simonebioq@hotmail.com

Abstract

A sustained virological response is not achieved by a significant proportion of chronic hepatitis C patients treated with interferon-based regimens. Due to the associated side effects and high costs, therapy response markers have been thoroughly sought. Two Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), rs12979860 and rs8099917, which are located upstream from the *IL28B* gene, have been remarkably described to have a strong association with treatment efficacy. The aim of this study was to develop a straightforward method for genotyping such polymorphisms. Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by enzymatic restriction of amplicons was established for SNPs genotyping. Online computation resources were employed for retrieving reference sequences, such as the selection of oligonucleotides and restriction enzymes. Two pairs of primers were designed and validated for the amplification of segments encompassing rs12979860 (694 bp) and rs8099917 (496 bp) with common thermocycling parameters. The endonucleases *Hpy166II* and *BsrDI* were selected and used for allelic discrimination related to rs12979860 (C/T) and rs8099917 (T/G), respectively. The expected electropherotypes were confirmed for all possible genotypes in 75 blood samples. In addition, the results were validated by sequencing. The method proposed constitutes a simple and reliable assay, which may be readily available for genotyping of rs12979860 and rs8099917 in laboratories that support hepatitis C treatment centers.

Keywords: *IL28B*, Single Nucleotide Polymorphism, PCR-RFLP, Hepatitis C.

1 Introduction

Most infections with hepatitis C virus (HCV) do not resolve spontaneously. Currently, it is estimated that 130 to 170 million people are chronically infected with HCV and are at a risk of developing liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). More than 350,000 people die every year from liver disease caused by HCV (WHO, 2011).

Recently, new drugs that are based on viral protease inhibition have received authorization for its inclusion in the treatment regime for hepatitis C infection. In most countries, however, the standard protocol for the treatment of chronic hepatitis C is still the combination of pegylated interferon alfa-2a or -2b (PegIFN- α -2a/2b) and

ribavirin (RBV), which is associated with high failure rates due to its limited efficacy and significant adverse effects (Tsubota et al., 2011).

The success of interferon-based therapy for hepatitis C depends on a combination of both viral and host factors (Tai and Chung, 2009). The HCV genotype is an important predictor of the therapeutic response, and it has been widely demonstrated that patients infected with HCV genotype 1 are less likely to achieve a sustained virological response than those infected with other viral genotypes. However, several investigators have studied the possible association between the host's genetic background and the response to interferon-based therapy (Kau et al., 2008). Some investigators have suggested that the regulation by interferon-stimulated genes (ISG) is related to the response to treatment (Feld et al., 2007 and Sarazin- Filipowicz et al., 2008).

In an extensive genome-wide association study (GWAS), Ge et al. (2009) showed that a genetic polymorphism (rs12979860) close to the *IL28B* gene is strongly associated with a sustained response to the treatment of chronic hepatitis C. Thomas et al. (2009) also reported that this polymorphism is associated with the spontaneous clearance of HCV.

Other major studies have identified different polymorphisms, which are also associated with anti-HCV therapy. Rauch et al. (2010), Suppiah et al. (2009) and Tanaka et al. (2009) reported that the rs8099917 polymorphism, also near the *IL28B* gene, is associated with the sustained virological response and the null virological response.

These studies have demonstrated the important role of genotyping the patient as a prognostic factor in the treatment of hepatitis C. Despite the relevance of the experimental findings, the discrimination of genotypes is still limited to research

laboratories due to its high complexity and costs of biomolecular analytical methods. Therefore, it could be convenient to have the ability to perform routine genotyping of rs12979860 and rs8099917 in clinical laboratories. Thus, the knowledge gained in research could be incorporated into daily clinical practice.

The aim of this study was to develop a less complex and a low cost molecular tool for the analysis of the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) close to *IL28B* gene that could be employed for identifying the host genetic variability related to the prognosis of hepatitis C treatment.

2 Materials and methods

2.1 Subjects and samples

Seventy-five residual blood samples were obtained from the regional blood bank in Joinville, Southern Brazil with written informed consent from the donors. The genomic DNA was extracted with a Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) under the manufacturer's instructions. The study was approved by the Institutional Review Board at Univille - University of Region of Joinville under protocol 136/10.

2.2 Design of SNPs genotyping

The reference nucleotide sequences corresponding to polymorphisms rs12979860 C/T and rs8099917 T/G were retrieved from the Entrez SNP database

(www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) and analyzed with BLAST[®] tools (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) as described elsewhere (Altschul et al., 1997).

The online tool Nbcutter V2.0 (www.tools.neb.com/NEBcutter2) was employed for the selection of restriction enzymes, which are able to distinguish between variant alleles related to SNPs rs12979860 and rs8099917 (Vincze et al., 2003). The simulation of DNA cutting by the proposed enzymes and the analysis of the foreseen restriction profiles were performed with the REBsites software (www.tools.neb.com/REBsites/index.php) (Roberts et al., 2010).

The online program Primer 3 v.0.4.0 (www.frodo.wi.mit.edu/primer3/) was employed for designing multiple pairs of PCR primers (Rozen and Skaletsky, 2000), followed by the elimination of candidates with a high cross-hybridization potential via BLAST[®].

2.3 Evaluation of the method proposed

The conventional requirements for the prevention of cross-contamination were observed in the preparation of the PCR master mix. The thermocycling was conducted in XP Cycler apparatus (BIOER Technology Co., Tokyo, Japan). The amplicons and restriction enzymes were subjected to reaction conditions of *Hpy166II* and *BsrDI* established by the manufacturer (New England Biolabs, Beverly, USA). After enzymatic digestion, the fragments were separated by agarose gel electrophoresis (8 V/cm - *Hpy166II* and 10 V/cm - *BsrDI*) in Tris-borate (TBE) buffer containing ethidium bromide (0.5 µg/mL). The results were scanned and recorded after UV light exposure (Minibis-Pro Photodocumentation System, DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalem, Israel).

Additionally, 25 amplicons of the representative genotypes were selected and submitted for direct and bi-directional sequencing in an ABI 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) with the Big Dye[®] Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The sequences were analyzed using the tool ClustalW (Thompson et al., 1994), which is available in the BioEdit 7.0.9 software (Hall, 1999).

3 Results

3.1 Establishment of Polymerase Chain Reaction Parameters

Two complementary PCR were defined for the amplification of genomic segments encompassing rs12979860 and rs8099917. After analysis of multiple oligonucleotide sets provided by program Primer 3, the primers were defined based on their thermodynamic characteristics (Table 1).

Table 1 - PCR primers defined for the evaluation of polymorphisms rs12979860 and rs8099917.

| SNP | Primer | Sequence (5' to 3') | Tm (°C) | GC (%) | Direction | Product Size (bp) |
|------------|--------------------|----------------------|---------|--------|-----------|-------------------|
| rs12979860 | <i>IL28B</i> -860F | AGCAGGACAGATTGGCAAAG | 60.40 | 50.0 | Sense | 694 |
| | <i>IL28B</i> -860R | CACAATTCCCACCGAGAC | 61.38 | 55.0 | Antisense | |
| rs8099917 | <i>IL28B</i> -917F | CTGGAACAAATCGTCCCAAT | 59.79 | 45.0 | Sense | 496 |
| | <i>IL28B</i> -917R | TTCCTTTAGGCCTGTGGATG | 60.07 | 50.0 | Antisense | |

The sequential tests were performed for the optimization of both reactions by varying the amount of primers and magnesium ion concentration, followed by the adjustment of the thermocycling steps. Thus, the recommended components and their quantities for PCR were as follows: 50 - 500 ng of template DNA; 1 U of Platinum[®] Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil); 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate (GE Healthcare, Little Chalfont, UK); 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen); PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl) and 10 pmol of each primer (Eurofins MWG Operon, Huntsville, USA) in a total volume of 50 μ L. The reaction designed for the amplification of the segment related to rs12979860 was enhanced by the addition of 5% dimethyl sulfoxide (Amresco, Ohio, USA).

The common optimal temperature for the annealing of both sets of primers was defined at 60°C. The best results were obtained with the initial denaturation at 94°C for 3 min; followed by 40 cycles, including denaturation at 94°C for 30 s; annealing at 60°C for 30 s; extension at 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 7 min. Figure 1 presents the amplicons corresponding to rs12979860 (694 bp) and rs8099917 (496 bp) after 1% agarose gel electrophoresis.

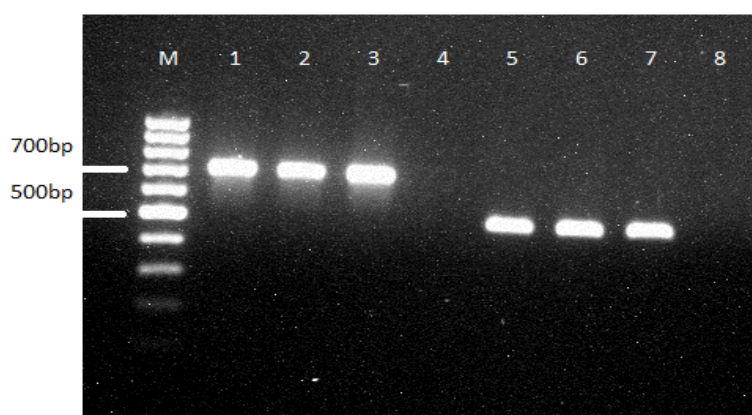


Figure 1 – Amplicons obtained with optimized PCR parameters regarding SNPs rs12979860 (694 bp) (lanes 1, 2, and 3) and rs8099917 (496 bp) (5, 6, and 7). (M) molecular size marker (*Gene Ruler*[™] 100-bp Ladder, Fermentas, Ontario, Canada); (4) and (8) negative controls.

3.2 Defining the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis

The RFLP technique was defined for the intended allelic discrimination due to its practicality. The restriction enzymes selected for each SNP and their predicted combination of fragments after digestion of variant genotypes are shown on Table 2.

Table 2 - Restriction enzymes selected for the analysis of polymorphisms rs12979860 and rs8099917

| SNP | Alleles | Restriction Enzyme | Sequence of recognition ^{a,b} | Genotypes | Fragments (bp) |
|------------|---------|--------------------|--|-----------|----------------------|
| rs12979860 | C/T | <i>Hpy166II</i> | GTN↓NAC | C/C | 509 + 185 |
| | | | | C/T | 509 + 185 + 155 + 30 |
| | | | | T/T | 509 + 155 + 30 |
| rs8099917 | T/G | <i>BsrDI</i> | GCAAT G NN↓ | T/T | 496 |
| | | | | T/G | 496 + 272 + 224 |
| | | | | G/G | 272 + 224 |

^a Bold letters indicate the allelic variants positioning inside each enzyme recognition sequence.

^b Down arrows indicate the site of cleavage.

The digestions were performed separately in a total volume of 20 μ L. *Hpy166II* was employed for C/T discrimination of SNP rs12979860, while T/G distinction related to rs8099917 was possible with *BsrDI*. Incubations were performed at 37°C (*Hpy166II*) or 65°C (*BsrDI*) for 2 h. The products of digestion with *Hpy166II* were separated properly by 3% agarose gel electrophoresis for 2 h, as shown in Figure 2. Figure 3 presents the eletrophoretic patterns corresponding to amplicons digested by *BsrDI*, which were obtained in 1.5% agarose gels after 1.5 h.

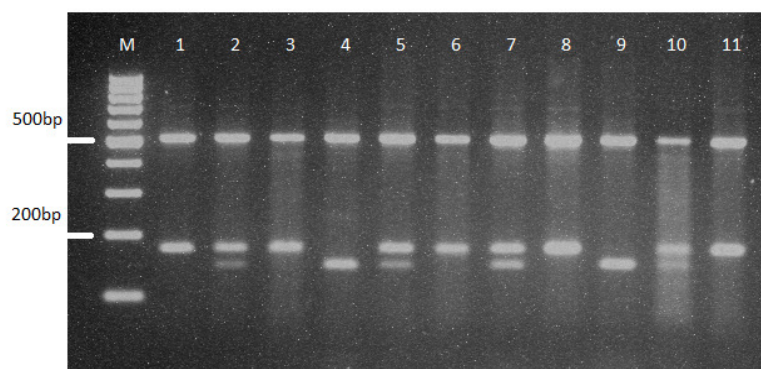


Figure 2 – Electrophoretic patterns related to SNP rs12979860 after digestion by *Hpy166II*. (M) molecular size marker (*Gene Ruler*TM 100-bp Ladder, Fermentas, Ontario, Canada); (1), (3), (6), (8), and (11) - genotype C/C; (2), (5), (7), and (10) - genotype C/T; (4) and (9) - genotype T/T.

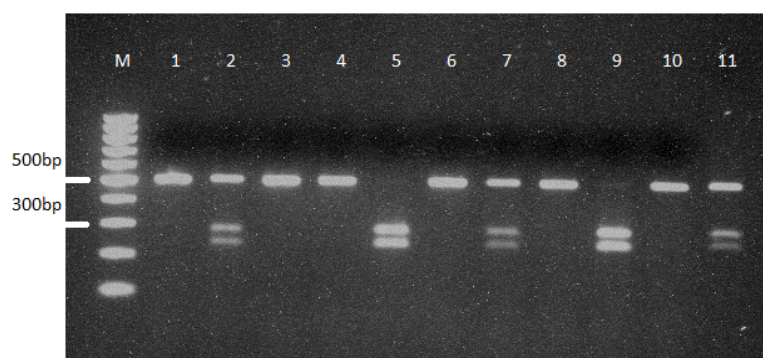


Figure 3 – Electrophoretic patterns related to SNP rs8099917 after digestion by *BsrDI*. (M) molecular size marker (*Gene Ruler*TM 100-bp Ladder, Fermentas, Ontario, Canada); (1), (3), (4), (6), (8), and (10) - genotype T/T; (2), (7), and (11) - genotype T/G; (5) and (9) - genotype G/G.

RFLP genotyping profiles were confirmed by bi-directional sequencing of the representative amplicons of each genotype (data not shown).

3.3 Genotyping of the blood donors' samples

We performed genotyping of DNA samples from volunteers without serum markers of viral hepatitis using the method described in this manuscript. We found

52.0% of samples displaying genotype rs12979860 CC, followed by 40.0% CT, and 8.0% TT. In addition, the analysis of SNP rs8099917 revealed 70.7% TT, 25.3% TG, and 4% GG.

4 Discussion

Based on a case-control comparison of the entire genome map, Ge et al. (2009) were able to show that variations near the *IL28B* gene were strongly related to interferon-based therapy response in hepatitis C patients. Although several SNPs were identified, the polymorphism rs12979860 (3 kb upstream from *IL28B* gene) was found to have a strong association with the virological response. In this study, patients with the CC genotype (rs12979860 CC) had sustained virological response frequencies twice as high as the patients with TT genotype in all ethnic groups. It was also demonstrated that the *IL28B* polymorphisms were responsible for at least half of the therapy response rate differences observed between individuals with Caucasian and African genetic background. Many studies have also suggested a strong association between the genotype CC of SNP rs12979860 and the sustained virological response to interferon-based regimens (Ladero et al., 2011; Lindh et al., 2011; McCarthy et al., 2010; Montes-Cano et al., 2010).

Rauch et al. (2010), Suppiah et al. (2009) and Tanaka et al. (2009) reported another polymorphism, rs8099917, which was located 8 kb from the *IL28B* gene, to have a significant association with sustained virological response and null virological response in hepatitis C treatment. In a European cohort study, sustained virological response was achieved in 55.9% of 442 patients with the TT genotype (rs8099917 TT) and in 36.4% and 30.6% of the patients with TG (n = 357) and GG (n = 49)

genotypes, respectively (Suppiah *et al.*, 2009). Other studies have confirmed the association between the SNP rs8099917 and the outcomes of interferon-based therapies (Aparicio *et al.*, 2010; Fukuhara *et al.*, 2010; Lindh *et al.*, 2011).

The genotyping of *IL28B* SNPs provides valuable information regarding the patient's chance of achieving sustained virological response for the treatment of chronic hepatitis C, which is increasingly relevant in clinical practice (Garcia *et al.*, 2011). Those patients who are considered good responders to antiviral treatment based on *IL28B* genotyping may have shortened durations of treatment. Therefore, it can provide an individualized and effective therapy regimen (Garcia *et al.*, 2011; Georgel *et al.*, 2010). Recently, it has been shown that the investigation of *IL28B* polymorphisms at the baseline may help to predict the response to hepatitis C novel therapies, which are composed of PegIFN- α , RBV and boceprevir/telaprevir (Karino *et al.*, 2011; Poordad *et al.*, 2011). Additionally, some studies have emphasized the association of *IL28B* SNPs with the response to therapy after liver transplantation in patients with hepatitis C recurrence. Charlton *et al.* (2011) and Fukuhara *et al.* (2010) found higher sustained virological response rates when donor and recipient were homozygous for the genotypes (rs12979860 CC and rs8099917 TT). According to Charlton *et al.* (2011), donors showing genotype rs12979860 CC should be preferentially matched to HCV-infected patients with end-stage liver disease.

However, the routine application of this investigation has not occurred widely because most studies have been performed in research facilities using complex and expensive molecular biology procedures, which are not available in clinical laboratories. The Illumina Human610-quad BeadChip and Affymetrix SNP 6.0 genome-wide SNP typing array were used during the GWAS stage for SNP identification (Ge *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009). Afterwards, DNA sequencing

(Aparicio et al., 2010; Asselah et al., 2012), TaqMan 5' allelic discrimination assay (McCarthy et al., 2010; Montes-Cano et al., 2010; Rallón et al., 2012), Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR) (Akkarathamrongsin et al., 2010; Galmozzi et al., 2011; Hashemi et al., 2012), and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (Sinn et al., 2011) were the most common methods for screening. Real-time PCR shows high sensitivity, speed, and a low risk of contamination, and DNA sequencing is considered the most reliable technique for the detection of mutations. However, these techniques require higher performance ability and advanced equipment, which are usually more expensive than conventional PCR (Guirguis; Abbas e Azzazy, 2010; Novais e Alves, 2004).

The current study was designed to develop a method for genotyping the relevant *IL28B* polymorphisms based on PCR-RFLP technique, which is compatible to facilities found in most clinical laboratories and takes no longer than eight hours for the whole procedure. We have used primers not previously described, and the chosen endonucleases for the RFLP showed to be valuable for obtaining the intended discrimination of digested amplicons at electrophoresis.

PCR-RFLP may be performed using a conventional thermocycler and an electrophoresis apparatus (Caetano, 2009). This technique is accurate, cheap, fast, convenient to operate (Ota et al., 2007), and may offer a reliable alternative for analysis of these important polymorphisms when Real-time PCR or DNA sequencing are not available. We have succeeded in demonstrating a standardized method that has low-cost implementation, which can easily be reproduced for clinical application.

Conclusion

The proposed method constitutes a simple and reliable assay for the genotyping of SNPs rs12979860 and rs8099917, related to the *IL28B* gene, which can be readily investigated, along with the traditional clinical and laboratory markers, to predict the response to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C disease.

Acknowledgements

This study was supported by grants from FAPESC (Research and Innovation Support Foundation of the State of Santa Catarina) and FAP – UNIVILLE (Research Fund from University of Region of Joinville. FAP/UNIVILLE.

5 References

- Akkarathamrongsin, S., Sugiyama, M., Matsuura, K., Kurbanov, F., Poovorawan, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., 2010. High sensitivity assay using serum sample for *IL28B* genotyping to predict treatment response in chronic hepatitis C patients. *Hepatol. Res.* 40, 956-962.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Aparicio E., Parera, M., Franco, S., Pérez-Alvarez, N., Tural, C., Clotet, B., 2010. *IL28B* SNP rs8099917 is strongly associated with pegylated interferon- α and ribavirin therapy treatment failure in HCV/HIV-1 coinfecting patients. *PLoS One.* 5, e13771.
- Asselah, T., De Muynck, S., Bröet, P., Masliah-Planchon, J., Blanluet, M., Bièche, I., Lapalus, M., Martinot-Peignoux, M., Lada, O., Estralaud, E., Zhang, Q., El Ray, A., Vidaud, D., Ripault, M., Boyer, N., Bedossa, P., Valla, D., Vidaud, M., Marcellin, P.,

2012. IL28B polymorphism is associated with treatment response in patients with genotype 4 chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 56, 527-532.

Caetano, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *Revista Brasileira de Zootecnia.* v. 38, p. 64-71, 2009.

Charlton, M.R., Thompson, A., Veldt, B.J., Watt, K., Tillmann, H., Poterucha, J.J., Heimbach, J.K., Goldstein, D., McHutchison, J., 2011. Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 53, 317-324.

Entrez SNP. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Accessed: 07/07/2011.

Feld, J.J., Nanda, S., Huang, Y., Chen, W., Cam, M., Pusek, S.N., Schweigler, L.M., Theodore, D., Zacks, S.L., Liang, T.J., Fried, M.W., 2007. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology.* 46, 1548-1563.

Fukuhara, T., Taketomi, A., Motomura, T., Okano, S., Ninomiya, A., Abe, T., Uchiyama, H., Soejima, Y., Shirabe, K., Matsuura, Y., Maehara, Y., 2010. Variants in *IL28B* in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology.* 139, 1577-1585.

Galmozzi, E., Menico, B.D., Rametta, R., Dongiovanni, P., Fracanzani, A.L., Benedan, L., Borroni, V., Maggioni, P., Fargion, S., Valenti, L., 2011. A tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction for the evaluation of rs12979860 *IL28B* genotype. *J. Viral Hepat.* 18, 628-630.

Garcia, S. L., Coto-Llerena, M., Gallart, S.P.P., Bernhardt, X.F., 2011. Genética y tratamiento de la hepatitis C: hacia un tratamiento personalizado? *Gastroenterol. Hepatol.* 34, 352-360.

Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., Heizen, E.L., Qiu, P., Bertelsen, A.H., Muir, A.J., Sulkowski, M., McHutchinson, J.G., Goldstein, D.B., 2009. Genetic variation in *IL28B* Predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 462, 399-401.

Georgel, P., Schuster, C., Zeisel, M.B., Stoll-Keller, F., Berg, T., Bahram, S., Baumert, T.F., 2010. Virus-Host Interactions in Hepatitis C virus infection: Implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends Mol. Med.* 16, 277-286.

Guirgis, B.S.S., Abbas, R.O., Azzazy, H.M.E., 2010. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *Int. J. Infect. Dis.* 14, e941-e953.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). *Nucleic. Acids Symp. Ser.* 41, 95-98.

Hashemi, M., Moazeni-Roodi, A., Bahari, A., Taheri, M., A , 2012. Tetra-Primer Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction for the detection of rs8099917 IL28B genotype. *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 31, 55-60.

Karino, Y., Ozeki, I., Toyota, J., Imamura, M., Tsuge, M., Chayama, K., Sezaki, H., Akuta, N., Kumada, H., 2011. *IL28B* genotype major and relapse of previous PEG-IFN/RBV therapy are the convincing predictor of sustained virological response in telaprevir with PEG-IFN/RBV therapy. *J. Hepatol.* 54, s525.

Kau, A., Vermehren, J., Sarrazin, C., 2008. Treatment predictors of a Sustained virologic response in hepatitis B and C. *J. Hepatol.* 49, 634-651.

Ladero, J. M., Martin, E.G., Fernández, C., Carballo, M., Devesa, J., Matínez, C., Suárez, A., Díaz-Rubio, M., Agúndez, J.A., 2011. Predicting response to therapy in chronic hepatitis C: an approach combining *IL28B* gene polymorphisms and clinical data. "Accepted article"; doi:10.1111/j. 1440 – 1746.2011.06834.x. *J. Gastroenterol. Hepatol.*

Lindh, M., Lagging, M., Arnholm, B., Eilard, A., Nilsson, S., Norkrans, J., Söderholm, J., Wahlberg, T., Wejstal, R., Westin, J., Hellstrand, K., 2011. *IL28B* polymorphisms determine early viral kinetics and treatment outcome in patients receiving peginterferon/ribavirin for chronic hepatitis C genotype 1. *J. Viral Hepat.* 18, 325-331.

Mccarthy, J.J., Li, J.H., Thompson, A., Suchindran, S., Lao, X.Q., Patel, K., Tillmann, H.L., Muir, A.J., McHutchison, J.G., 2010. Replicated association between an *IL28B* gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology.* 138, 2307-2314.

Montes-cano, M. A., García-Lozano, J.R., Abad-Molina, C., Romero-Gómez, M., Barroso, N., Aguilar-Reina, J., Núñez-Róldan, A., González-Escribano, M.F., 2010. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology.* 52, 33-37.

Novais, C.M., Pires-Alves, M., 2004. PCR em Tempo Real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* ed 3, p. 10-13.

Ota, M. *et al.* Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protocols.* v. 2, p. 2857-2864, 2007.

Poordad, F., Bronowicki, P., Gordon, S.C., Zeuzem, S., Jacobson, I.M., Sulkowski, M.S., Poynard, T., Morgan, T.R., Burroughs, M., Sniukiene, V., Boparai, N., Brass, C.A., Albrecht, J.K., Bacon, B.R., 2011. *IL28B* polymorphism predicts virologic response in patients with hepatitis C genotype 1 treated with boceprevir (BOC) combination therapy. *J. Hepatol.* 54, s6.

Rallón, N., Soriano, V., Naggie, S., Restrepo, C., McHutchison, J., Vispo, E., Benito, J.M., 2012. Impact of *IL28B* gene polymorphisms on interferon- λ 3 plasma levels

during pegylated interferon- α /ribavirin therapy for chronic hepatitis C in patients coinfecting with HIV. doi: 10.1093/jac/dkr598. J. Antimicrob. Chemother.

Rauch, A., Kutalik, Z., Descombes, P., Cai, T., Di Lulio, J., Mueller, T., Bochud, M., Battegay, M., Bernasconi, E., Borovicka, J., Colombo, S., Cerny, A., Dufour, J.F., Furrer, H., Günthard, H.F., Heim, M., Hirschel, B., Malinverni, R., Moradpour, D., Müllhaupt, B., Witteck, A., Beckmann, J.S., Berg, T., Bergmann, S., Negro, F., Telenti, A., Bochud, P.Y., 2010. Genetic variation in *IL28B* is Associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a Genome-Wide Association Study. Gastroenterology. 138, 1338-1345.

Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D., 2010. Rebase: a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. Nucl. Acids Res. 38, 234-236.

Rozen, S., Skaletsky, H. J., 2000. Primer 3 on the www for general user and for biologist programmers. In: KRAWETS, S. Misener, S. Bioinformatics methods and protocols. Methods Mol. Biol. Humana Press, Totowa, NJ. 365-386.

Sarazin-filipowicz, M., Oakeley, E.J., Duong, F.H.T., Christen, V., Terracciano, L., Filipowicz, W., Heim, M.H., 2008. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 7034-7039.

Sinn, D.H., Kim, Y.J., Lee, S.T., Gwak, G.Y., Choi, M.S., Lee, J.H., Koh, K.C., Yoo, B.C., Palk, S.W., 2011. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in Asian patients. J. Gastroenterol. Hepatol. 26, 1374-1379.

Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M.L., Bassendine, M., Spengler, U., Dore, G.J., Powell, E., Riordan, S., Sheridan, D., Smedile, A., Fragomeli, V., Müller, T., Bahlo, M., Stewart, G.J., Booth, D.R., George, J., 2009. *IL28B* Associated with response to chronic hepatitis C response to interferon- α and ribavirin therapy. Nat. Genet. 41, 1100-1104.

Tai, A. W., Chung, R. T., 2009. Treatment failure in hepatitis C: Mechanisms of non-response. J. Hepatol. 50, 412-420.

Tanaka, Y., Nishida, N., Sugiyama, M., Kurosaki, M., Matsuura, K., Sakamoto, N., Nakagawa, M., Korenaga, M., Hino, K., Hige, S., Ito, Y., Mita, E., Tanaka, E., Mochida, S., Murawaki, Y., Honda, M., Sakai, A., Hiasa, Y., Nishiguchi, S., Koike, A., Sakaida, I., Imamura, M., Ito, K., Yano, K., Masaki, N., Sugauchi, F., Izumi, N., Tokunaga, K., Mizokami, M., 2009. Genome-Wide Association *IL28B* with the response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Nat. Genet. 41, 1105-1109.

Thomas, D. L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O'huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S.I., Alexander, G., Goedert, J.J., Kirk, G.D., Donfield, S.M., Rosen, H.R., Tobler, L.H., Busch, M.P., McHutchison, J.G., Goldstein, D.B., Carrington, M., 2009. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature. 461, 798-801.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680.

Tsubota, A., Fujise, K., Namiki, Y., Tada, N., 2011. Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. World J. Gastroenterol. 17, 419-432.

Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R. J., 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucl. Acids Res. 31, 3688-3691.

WHO _ World Health Organization. Hepatitis C Virus. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Accessed: 07/07/2011.

Confirmação da Submissão do Artigo à Revista

Dear Simone,

Your submission entitled "Straightforward genotyping of relevant IL28B SNPs for the prediction of hepatitis C treatment outcome." has been received by Journal of Virological Methods

It has been assigned the following manuscript number: VIRMET-D-11-00612.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/virmet/>.

Your username is: simone.moreira

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/virmet/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Journal of Virological Methods

CONCLUSÕES

Desenvolveu-se um sistema original simplificado para a análise dos SNPs rs12979860 e rs8099917, localizados próximos ao gene *IL28B*, capaz de ser utilizado na prática clínica.

- Identificaram-se a existência de endonucleases capazes de reconhecer uma das formas variantes dos polimorfismos rs12979860 (C/T) e rs8099917 (T/G).
- Planejaram-se sequências de oligonucleotídeos capazes de permitir a amplificação e detecção das regiões contendo os polimorfismos em estudo.
- Padronizou-se uma metodologia de PCR para a amplificação das regiões gênicas onde se encontram os polimorfismos.
- Padronizou-se uma metodologia de RFLP para a definição dos genótipos correspondentes aos polimorfismos rs12979860 (CC, CT e TT) e rs8099917 (TT, TG e GG).

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AKUTA, N. *et al.* Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. **Hepatology**. v. 52, n. 2, p. 421-429, 2010.

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402, 1997. Disponível em: <<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 7 jul. 2010.

ANK, N. *et al.* Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. **J Virol**. v. 80, n. 9, p. 4501-4509, 2006.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 3 jan. 2012.

APARICIO, E. *et al.* IL28B SNP rs8099917 is strongly associated with pegylated interferon- α and ribavirin therapy treatment failure in HCV/HIV-1 coinfecting patients. **J PLoS One**. v. 5, n. 10, e13771, 2010.

ASSELAH, T. *Genetic polymorphism and response to treatment in chronic hepatitis: the future of personalized medicine*. **J Hepatol**. v. 52, p. 452-454, 2010.

ASSELAH, T. *et al.* IL28B Polymorphism is associated with treatment response in patients with genotype 4 chronic hepatitis C. **J Hepatol**. v. 56, p. 527-532, 2012.

ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. STRAUSS, E. *et al.* **Projeto Diretrizes**. Hepatite C crônica: tratamento. Brasília, 2009.

BARTENSCHLAGER, R.; BÜHLER, S. *Hepatitis C virus*. Encyclopedia of Virology. 3 ed, p. 367-374, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. Acesso em: 8 jul. 2010.

BARTLETT, J.M.S.; STIRLING, D. **Methods in molecular biology – PCR protocols**. 2 ed. v. 226. Totowa, New Jersey: Human Press, 2003.

BLATT, C.R. *et al.* Tratamento da hepatite C e qualidade de vida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 90, n. 1, p. 19-26, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hepatites Virais: o Brasil está atento**. 3 ed. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções**. Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21920>. Acesso em: 19 jul. 2011.

BRONOWICKI, J.P. *et al.* *Response-guided therapy (RGT) with boceprevir (BOC) + peginterferon alfa-2b/ribavirina (P/R) for treatment-naïve patients with hepatitis C virus (HCV) genotype (G) 1 was similar to a 48-wk fixed-duration regimen with BOC + P/R in SPRINT-2 (abstract LB-15)*. **Hepatology**. v. 52 (suppl. 1), 881A, 2010.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 38, p. 64-71, 2009.

CAMPBELL, M.K.; FARREL, S.O. **Bioquímica** – biologia molecular. 5 ed. v. 2. São Paulo: Thompson Learning, 2007.

CAMPIOTTO, S. *et al.* *Geografic distribution of hepatitis C vírus genotypes in Brazil*. **Braz J Med Biol Res**. v. 38, p. 41-49, 2005.

CANO, A.B.; LÓPEZ, S.A.; RODRÍGUEZ, C.F. *Tratamiento de las hepatitis virales*. **Medicine, Madrid**. v. 9, n. 92, p. 5921-5930, 2007.

CARLSSON, T. *et al.* *Hepatitis C virus RNA kinetics during the initial 12 weeks treatment with pegylated interferon-alpha 2a and ribavirin according to virological response*. **J Viral Hepat**. v. 12, n. 5, p. 473-480, 2005.

CARVALHO, C.A.M. **Aplicação Médico-Legal da PCR em Tempo Real na Caracterização de SNPs**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Forenses) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto.

CHARLTON, M.R. *et al.* Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. **Hepatology**. v. 53, p. 317-324, 2011.

CHOO, Q-L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**. v. 244, p. 359-362, 1989.

CLARK, V.; NELSON, D.R. *Novel interferons for treatment of hepatitis C virus*. **Clin Liver Dis**. Florida, v. 13, p. 351-363, 2009.

CONJEEVARAN, H.S. *et al.* Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. **Gastroenterology**. v. 131, p. 470-477, 2006.

DELGREEN, C. *et al.* Human interferon- λ 3 is a potent member of the type III interferon family. **Genes and Immun**. v. 10, p. 125-131, 2009.

ECDC – European Center for Disease Prevention and Control. **Hepatitis C. 2005 – 2009**. Disponível em: <<http://www.ecdc.europa.eu/em/healthtopics>>. Acesso em: 15 jun. 2010.

ENOMOTO, N.; MAEKAWA, S. *HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy*. **Intervirology**. v. 53, p. 66-69, 2010.

ESCOBAR, J.S. *Ribavirina y análogos*. **J Gastroenterol Hepatol**. v. 29, p. 129-134, 2006.

EVANS, M.F. *The polymerase chain reaction and pathology practice*. **Diagnostic Histopathology**. v. 15, n. 7, p. 344-356, 2009.

FELD, J.J. *et al.* *Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response*. **Hepatology**. 46, 1548-1563, 2007.

FERENCI, P. *et al.* Predicting sustained virological responses in chronic hepatitis C patients treated with peginterferon alfa-2a (40KD)/ribavirin. **J Hepatol.** v. 43, p. 425-433, 2005.

FERNANDES, F.F. **Fatores Prognósticos e de Efetividade do Tratamento da Hepatite C Crônica.** 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C. **Oncologia Molecular.** São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

FUKUHARA, T. *et al.* Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. **Gastroenterology.** v. 139, n. 5, p. 1577-1585, 2010.

GARCIA, S.L. *et al.* Genética y tratamiento de la hepatitis C: hacia un tratamiento personalizado? **Gastroenterol Hepatol.** v. 34, n. 5, p. 352-360, 2011.

GE, D. *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature.** v. 462, n. 17, 2009.

GEORGEL, P. *et al.* Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. **Trends Mol Med.** v. 16, n. 6, p. 277-286, 2010.

GHANY, M.G. *et al.* Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology.** v. 49, p. 1335-1374, 2009.

GIBSON, N.J. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. **Clinica Chimica Acta.** v. 363, p. 32-47, 2006.

GUIRGIS, B.S.S.; ABBAS, R.O.; AZZAZY, H.M.E. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. **Int J Infect Dis.** v. 14, p. e941-e953, 2010.

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

HIRATA, M.H.; TAVARES, V.; HIRATA, R.D.C. Da Biologia Molecular à Medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. *In: _____*. **Simpósio Farmacogenética**. Capítulo II, Medicina, Ribeirão Preto. v. 39, n. 4, p. 522-534, 2006.

HOFMANN, W.P. *et al.* Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis C nonstructural 5B quasispecies in vitro and during antiviral therapy. **Gastroenterology**. v. 132, p. 921-930, 2007.

HOFFMANN, W.P.; ZEUZEM, S. A new standard of care for the treatment of chronic HCV infection. *Nature Reviews*. **Gastroenterol Hepatol**. p. 1-8, 2011.

HOWELL, C.D. *et al.* Peginterferon pharmacokinetics in African American and Caucasian American patients with hepatitis C virus genotype 1 infection. **Clin Gastroenterol Hepatol**. v. 6, p. 575-583, 2008.

HUANG, C.F. *et al.* Efficacy and safety of pegylated interferon combined with ribavirin for the treatment of older patients with chronic hepatitis C. **J Infect Dis**. v. 201, n. 5, p. 751-759, 2010.

IMAZEKI, F.; YOKOSUKA, O.; OMATA, M. Impact of IL28B on control of hepatitis C virus infection: a Genome-Wide Association Study. **Expert Rev Anti Infect Ther**. v. 8, n. 5, p. 497-499, 2010.

JACOBSON, I.M. *et al.* Telaprevir in combination with peginterferon and ribavirin in genotype 1 HCV treatment-naïve patients: final results of phase 3 ADVANCE study (abstract 211). **Hepatology**. v. 52 (suppl. 1), 427A, 2010.

JACOBSON, I.M. *et al.* Telaprevir substantially improved SVR rates across all IL28B genotypes in the ADVANCE trial. **J. Hepatol**. v. 54(S1):S542-S543, 2011.

JESUDIAN, A.B.; GAMBARIN-GELWAN, M.; JACOBSON, I.M. Advances in the treatment of hepatitis C virus infection. **Gastroenterol Hepatol**. v. 8, p. 91-101, 2012.

JORDE, L.B. Desequilíbrio de ligação e a busca de genes de doenças complexas. **Genome Res**. v. 10, p. 1435-1444, 2000.

KAU, A.; VERMEHREN, J.; SARRAZIN, C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. **J. Hepatol**. v. 49, p. 634-651, 2008.

KALENDAR R.; LEE D.; SCHULMAN A.H. *Invited Review: FastPCR software for PCR primer and probe design and repeat search. Genes, Genomes and Genomics.* v. 3, n. 1, 2009.

KANDA, T.; IMAZEKI, F.; YOKOSUKA, O. *New antiviral therapies for chronic hepatitis C. Hepatol Int.* v. 4, p. 548-561, 2010.

KENT, W.J. *et al. The human genome browser at UCSC. Genome Res.* v. 12, n. 6, p. 996-1006, jun/2002. Disponível em: <<http://www.genome.ucsc.edu>>. Acesso em: 07 jul. 2010.

KIM, S.; MISRA, A. *SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. Annu Rev Biomed Eng.* v. 9, p. 289-320, 2007.

KOCH, A.; ANDRADE, F.M. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. **RBAC.** v. 40, n. 1, p. 17-23, 2008.

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

KWO, P.Y. *Phase III results in genotype 1 naïve patients: predictors of response with boceprevir and telaprevir combined with pegylated interferon ribavirin. Liver Int.* p. 39-43, 2012.

KWOK, P. *Method for genotyping single nucleotide polymorphisms. Annu Rev Genomics Hum Genet.* v. 2, p. 235-258, 2001.

LADERO, J.M. *et al. Predicting response to therapy in chronic hepatitis C: an approach combining IL28B gene polymorphisms and clinical data. J. Gastroenterol Hepatol.* v. 27, n. 2, p. 279-285, 2012.

LEE, S.S.; FERENCI, P. *Optimizing outcomes in patients with hepatitis C virus genotype 1 or 4. Antivir Ther.* v. 13, p. 9-16, 2008.

LI, M. *et al. Interferons- λ : the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. J. Leukoc Biol.* v. 86, p. 23-31, 2009.

LIMA, L.M. **EMBRAPA Algodão.** Documentos, 191. Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular. Campinas Grande, 2008.

LINDH, M. *et al.* *IL28B* polymorphisms determine early viral kinetics and treatment outcome in patients receiving peginterferon/ribavirin for chronic hepatitis C genotype 1. **J. Viral Hepat.** v. 18, n. 7, p. 325-331, 2011.

MAEDA, M. *et al.* A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. **Tissue Antigens.** v. 34, n. 5, p. 290-298, 1989.

MAGGON, K. **Boceprevir (Victrelis) & telaprevir (Incivek, Incivo) Hepatitis C: FDA/EMA review & approval.** Disponível em: <<http://www.knol.google.com/k/krishan-maggon/boceprevir-victrelis-telaprevir-incivek/3fy5eowly8suq3/151#>>. Acesso em: 19 jul. 2011.

MANGIA, A. *et al.* An *IL28B* polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. **Gastroenterology.** v. 139, p. 821-827, 2010.

MARCELLO, T. *et al.* Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. **Gastroenterology.** v. 131, p. 1887-1898, 2006.

MCCARTHY, J.J. *et al.* Replicated association between an *IL28B* gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. **Gastroenterology.** v. 138, n. 4, p. 2307-2314, 2010.

MCPERSON, M.; MOLLER, S. **PCR.** 2 ed. New York: Taylor & Francis Group, up, 2006.

METZGER, I.F.; SOUZA-COSTA, D.C.; TANUS-SANTOS, F.E. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. In: Simpósio Farmacogenética, Medicina, Ribeirão Preto. v. 39, n. 4, p 515-521, 2006.

MOGHADDAM, A. *et al.* *IL28B* genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. **Hepatology** (Baltimore, Md.). v. 53, n. 3, p. 746-754, 2011.

MOLINA, A.L.; TOBO, P.R. Biologia Molecular – Atualização. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. **Einstein.** v. 2, n. 2, p. 139-141, 2004

MONTES-CANO, M.A. *et al.* Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. **Hepatology.** v. 52, p. 33-37, 2010.

MURPHY, D. *et al.* A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa (Abstract). **Hepatology**. v. 46, p. 623A, 2007.

NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 7 jul. 2010.

NGUYEN-KHAC, E. *et al.* Personalized therapy for chronic viral hepatitis C in the naïve patient: How can optimize treatment duration as a function of viral genotype? **Eur J Intern Med**. v. 18, p. 510-515, 2007.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em Tempo Real: uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. ed 3, p. 10-13, 2004.

O'BRIEN, T.R. Interferon-alfa, interferon- λ and hepatitis C. **Nature Genetics**. v. 41, n. 10, p 1048-1050, 2009.

OLIGO. Primer Analysis Software. Disponível em: <<http://www.oligo.net/index.html>>. Acesso em: 19 jul. 2011.

OTA, M. *et al.* Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Nature Protocols**. v. 2, p. 2857-2864, 2007.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; WALTER, M.R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptor. **Immunol Rev**. v. 202, p. 8-32, 2004.

PINEDA J.A. *et al.* Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL28B gene variation in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. **Clin Infect Dis**. v. 51, p. 788-195, 2010.

POL, S. *et al.* Similar SVR rates in IL28B CC, CT or TT prior relapse , partial- or null-responder patients treated with telaprevir/ peginterferon/ribavirin: retrospective analysis of the REALIZE study. **J. Hepatol**. v. 57(S1): S6-S7, 2011.

POORDAD, F. *et al.* Boceprevir (BOC) combined with peginterferon alfa-2b/ribavirin (P/R) for treatment-naïve patients with hepatitis C virus (HCV) genotype (G) 1: SPRINT-2 final results (abstract LB-4). **Hepatology**, v. 52 (suppl. 1), 402A, 2010.

POORDAD, F. *et al.* *IL28B polymorphism predicts virologic response in patients with hepatitis C genotype 1 treated with boceprevir (BOC) combination therapy.* **J. Hepatol.** v. 54(S1):S6, 2011.

POYNARD, T. *et al.* *Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa 2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C.* **Hepatology.** v. 38, n.1, p. 75-85, 2003.

PROSDOCIMI, F. *et al.* *Bioinformática: manual do usuário.* **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** v. 29, p. 12-25, 2003.

RALLÓN N.I. *et al.* *Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients.* **AIDS.** v. 24, p. 23-29, 2010.

RAUCH, A. *et al.* *Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a Genome-Wide Association Study.* **Gastroenterology.** v. 138, p. 1338-1345, 2010.

REGINATO, L.C.A.; VENERONI, G.B. *Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal.* In: II SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL. São Paulo. Anais. Embrapa Pecuária Sudeste, São Paulo, 2009.

REHERMANN, B. *Hepatitis C virus versus innate and adaptative immune responses: a tale of coevolution and coexistence.* **J. Clin Invest.** v. 119, n. 7, p. 1745-1754, 2009.

ROBERTS, R.J. *et al.* *Rebase: a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes.* **Nucl Acids Res.** v. 38, p. 234-236, 2010. Disponível em: <<http://www.rebase.neb.com/rebase/rebase.html>>. Acesso em: 7 jul. 2010.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. *Primer 3 for general user and for biologist programmers.* In: KRAWETS, S.; MISENER, S. **Bioinformatics methods and protocols: Methods Mol Biol.** Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000. Disponível em: <<http://www.frodo.wi.mit.edu/primer3/>>. Acesso em: 7 jul. 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** New York: CHS Press, 2001.

SANTALUCIA, J.Jr. *Physical principles and Visual-OMP software for optimal PCR design.* **Methods Mol Biol.** v. 402, p. 3-34, 2007.

SANTOS, F.R.; ORTEGA, J.M. **Bioinformática Aplicada à Genômica** – manuscrito para capítulo do Biowork IV. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2003. Disponível em: <<http://www2.dcce.ufs.br/images/3/33/Bio03.pdf>>. Acesso em: 11 jun. 2010.

SARAZIN-FILIPOWICZ, M. *et. al.* *Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C.* **PNAS**. v. 105, n. 19, p. 7034-7039, 2008.

SARRAZIN C. *et. al.* *Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients.* **J. Hepatol.** v. 54, p. 415-421, 2011.
SEEFF, L.B. Natural History of Chronic Hepatitis C. **Hepatology**. v. 36, n. 5, p. 35-46, 2002.

SBH - Sociedade Brasileira de Hepatologia. Disponível em: <<http://www.sbhepatologia.org.br>>. Acesso em: 3 jan. 2012 e

SHEPHERD, J. *et. al.* *Interferon alfa (pegylated and non-pegylated) and ribavirin for the treatment of mild chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation.* **Health Technol Assess.** v. 11, n. 11, 2007.

SOBRINO, B.; BRIÓN, M.; CARRACEBO, A. *SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies.* **Forensic Sci Int.** v. 154, p. 181-194, 2005.

SOMMEREYNS, C. *et. al.* *IFN-lambda (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo.* **PLoS Pathog.** v. 4, n. 3, p. 1-12, 2008.

SUPPIAH, V. *et. al.* *IL28B associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy.* **Nat Genet.** v. 41, n. 10, p. 1100-1104, 2009.

TAI, A.W.; CHUNG, R.T. *Treatment failure in hepatitis C: Mechanisms of non-response.* **J. Hepatol.** v. 50, p. 412-420, 2009.

TANAKA, Y. *et. al.* *Genome-Wide Association on IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.* **Nat Genet.** v. 41, n. 10, p. 1105-1109, 2009.

THOMAS, D.L. *et. al.* *Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus.* **Nature.** v. 461, n. 6, p. 798-801, 2009.

THOMPSON, A.J. *et. al.* Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in hepatitis C virus-1 patients. **Gastroenterology**. v. 20, n. 10, p. 1-10, 2010.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. e GIBSON, T.J. *Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.* **Nucleic Acids Res.** v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TSUBOTA, A. *et. al.* Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol.** v. 17, p. 419-432, 2011.

VIEIRA, D.P. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações.** Disponível em: <<http://www.etall.hpg.ig.com.br/aula1b.pdf>>. Acesso em: 1 nov. 2011.

VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R.J. *NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes.* **Nucleic Acids Res.** v. 31, p. 3688-3691, 2003. Disponível em: <<http://www.tools.neb.com/NEBcutter2/>>. Acesso em: 7 jul. 2010.

WHO - *World Health Organization.* **Hepatitis C - Fact sheet n. 164.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 7 jul. 2011.

ZAHA, A. *et. al.* **Biologia Molecular Básica.** 3 ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

ZEISEL, M.B.; COSSET, F.; BAUMERT, T.F. *Host Neutralizing Responses and Pathogenesis of Hepatitis C Virus Infection.* **Hepatology.** Jul: 48(1), p. 299-307. 2008.

ZEUZEM, S. *et.al.* Efficacy of 24 weeks treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 1 and low pretreatment viremia. **J. Hepatol.** v. 44, p. 97-103, 2006.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

No mundo todo, estima-se que 170 milhões de pessoas estejam infectadas cronicamente com o vírus da hepatite C. A maioria (70-80%) das infecções pelo HCV persiste e cerca de 30% das infecções persistentes evoluem para cirrose e carcinoma hepatocelular (câncer de fígado). Hoje, o tratamento para hepatite C crônica é a combinação de interferon peguilado mais ribavirina. Sabe-se, porém, que muitos pacientes não apresentam bons resultados a essa terapia. Diversos fatores influenciam na resposta ao tratamento. Esses fatores estão relacionados ao vírus e ao indivíduo. Recentemente, vários grupos identificaram variações genéticas do indivíduo associados à resposta ao tratamento da hepatite C. O estudo sobre qualquer aspecto que influencie na resposta à terapia é muito importante. Com esta pesquisa, espera-se contribuir para que, em um futuro próximo, o tratamento para hepatite C dê maiores possibilidades de cura para aqueles que apresentem a genética favorável, relacionada aos bons resultados.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que será realizada na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, que se intitula “**Desenvolvimento de ferramenta molecular para a análise de polimorfismos genéticos relacionados ao gene *IL28B***”, mediante conhecimento da sua proposta, riscos e benefícios. Esta pesquisa será realizada pela aluna do programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, Simone Moreira, orientada pelo Professor Dr. Mauro de Souza Leite Pinho. Para a devida execução, o projeto será realizado a partir da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Este estudo tem como objetivo desenvolver uma metodologia capaz de identificar a existência de pequenas diferenças, chamadas polimorfismos, na composição do material genético (DNA) de cada indivíduo. Essas variações poderão determinar, em parte, a resposta ao tratamento da hepatite C.

Para isso, será necessária sua autorização para utilizar sua amostra de DNA, estocada após obtenção para um estudo realizado anteriormente, denominado “Prevalência do polimorfismo do *gene* da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) na população de Joinville”, realizado pela pesquisadora Gabriela Ronconi Gastal,

mestranda do programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, no período de 2009 a 2010.

Na pesquisa atual somente serão investigadas as variações genéticas associadas ao tratamento da hepatite C, especificamente duas: rs12979860 e rs8099917, encontradas próximas ao *gene IL28B*, fortemente relacionadas com a resposta ao tratamento da hepatite C. As amostras continuarão estocadas conforme autorizados anteriormente, não sendo enviadas a outros centros. Nenhuma outra pesquisa, porém, será realizada sem que você seja contatado, informado e dê seu consentimento por escrito. Além disso, esse material somente será utilizado se o novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), quando for o caso.

Todos os resultados, dados pessoais e demais informações coletadas serão rigorosamente mantidos em sigilo e todos os participantes serão mantidos sob anonimato em quaisquer divulgações desta pesquisa. Para se evitarem quaisquer riscos não se permitirá o acesso de pessoas não autorizadas às amostras e aos resultados. É garantido seu direito de ser informado quanto ao resultado da pesquisa, se assim desejar. Em caso de quaisquer dúvidas relativas à pesquisa, você poderá contatar os responsáveis (vide contatos ao final do documento) antes, durante ou após a conclusão do estudo.

Os resultados a serem gerados por esta pesquisa ainda são considerados insuficientes para potencial aplicação imediata em critérios de diagnóstico e tratamento. Justamente por essa razão, não será realizado aconselhamento genético.

Sua participação não acarretará custos para você. Não haverá, também, compensação financeira (pagamento) a seu favor.

Você não será prejudicado(a) de forma alguma, caso decida pela não participação ou desistência a qualquer momento. Será possibilitada a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar o seu consentimento no andamento das atividades.

Você também tem o direito de pedir que seus dados genéticos ou sua amostra sejam destruídos a qualquer momento.

Atenção: Sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em

Pesquisa da UNIVILLE. Endereço: Campus Universitário, s/n – Bairro Bom Retiro.
Caixa Postal 246. CEP: 89219-905, Joinville, SC.

Declaração de Consentimento:

*Eu, _____ (nome do paciente), após ter lido (ou terem lido para mim) e compreendido este termo, tenho consciência de que não haverá remuneração de qualquer natureza e que poderei cancelar meu consentimento a qualquer momento. Autorizo o armazenamento de minha amostra de DNA para pesquisas futuras, desde que seja informado sobre os objetivos, riscos e benefícios destas novas pesquisas. Uma cópia deste documento será entregue a mim e outra permanecerá arquivada com os responsáveis pela pesquisa. Uma vez que meus questionamentos foram satisfeitos, autorizo livremente minha participação na pesquisa “**Desenvolvimento de ferramenta molecular para a análise de polimorfismos genéticos relacionados ao gene IL28B**”.*

Assinatura do Participante

Assinatura da Pesquisadora Responsável

Data: ___ / ___ / _____

Responsáveis pela pesquisa:

Aluna Mestranda (Pesquisadora Responsável): Simone Moreira

Professor Orientador: Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho

Professor Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

Instituição: Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE

Contatos:

Telefones:

Instituição (Laboratório de Pesquisa Saúde I): (47) 34619197

Simone Moreira: (47) 99614000

E-mail:

Simone Moreira: simonebioq@hotmail.com

ANEXOS

ANEXO A – Extração de DNA genômico – "Qiaamp DNA Mini Kit"/Qiagen

Second Edition

November 2007

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook

For DNA purification from
whole blood
plasma
serum
buffy coat
lymphocytes
dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only)
body fluids
cultured cells
swabs
tissue (QIAamp DNA Mini Kit only)

Sample & Assay Technologies



Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, FlexiGene®, Gentra Puregene®, nhibitEX®, MinElute®, TissueRuptor® (QIAGEN Group); Amicon®, Centricon®, UltraFree® (Millipore Corporation); DACRON® (E. I. du Pont de Nemours and Company); Puritan® (Hardwood Products Company); Triton® (Rohm and Haas Company); Tween® (ICI Americas Inc.). © 1999–2007 QIAGEN, all rights reserved.

Introduction

QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits provide fast and easy methods for purification of total DNA for reliable PCR and Southern blotting. Total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondrial) can be purified from whole blood, plasma, serum, buffy coat, bone marrow, other body fluids, lymphocytes, cultured cells, tissue, and forensic specimens. The simple QIAamp spin and vacuum procedures, which are ideal for simultaneous processing of multiple samples, yield pure DNA ready for direct amplification in just 20 minutes. The QIAamp spin procedures can be fully automated on the QIAcube® for increased standardization and ease of use (see page 15). The QIAamp procedure is suitable for use with fresh or frozen whole blood and blood which has been treated with citrate, heparin, or EDTA. Prior separation of leukocytes is not necessary. Purification requires no phenol/chloroform extraction or alcohol precipitation, and involves very little handling. DNA is eluted in Buffer AE or water, ready for direct addition to PCR or other enzymatic reactions. Alternatively, it can be safely stored at – 20°C for later use. The purified DNA is free of protein, nucleases, and other contaminants or inhibitors. DNA purified using QIAamp Kits is up to 50 kb in size, with fragments of approximately 20–30 kb predominating. DNA of this length denatures completely during thermal cycling and can be amplified with high efficiency. For purification of genomic DNA from blood for in vitro diagnostics in Europe, the QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit is CE-IVD-marked, compliant with EU Directive 98/79/EC. This kit is not available in the USA and Canada.

Principle and procedure

QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits are designed for rapid purification of an average of 6 µg of total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondrial) from 200 µl of whole human blood, and up to 50 µg of DNA from 200 µl of buffy coat, 5 x 10⁶ lymphocytes, or cultured cells that have a normal set of chromosomes. The procedure is suitable for use with whole blood treated with citrate, heparin, or EDTA;* buffy coat; lymphocytes; plasma; serum; and body fluids. Samples may be either fresh or frozen. For larger volumes of whole blood or cultured cells, we recommend using QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits. The QIAamp DNA Mini Kit performs all the functions of the QIAamp DNA Blood Mini Kit, and also allows rapid purification of DNA from solid tissue. On average, up to 30 µg of DNA can be purified from 25 mg of various human tissues.

Lysis with QIAGEN Protease or proteinase K

QIAamp DNA Blood Mini Kits contain QIAGEN Protease. Intensive research has shown that QIAGEN Protease is the optimal enzyme for use with the lysis buffer provided in the QIAamp DNA Blood Mini Kit. QIAGEN Protease is completely free of DNase and RNase activity. When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit for a sample that requires a modified protocol, please contact our Technical Service Department for advice about whether your lysis conditions are compatible with QIAGEN Protease. When >8 mM EDTA is used in conjunction with >0.5% SDS,* QIAGEN Protease activity decreases. For samples that require an SDS-containing lysis buffer or that contain high levels of EDTA, the QIAamp DNA Mini Kit is recommended. The QIAamp DNA Mini Kit contains proteinase K, which is the enzyme of choice for SDS-containing lysis buffers used in the Tissue Protocol, but which performs equally well in the Blood and Body Fluid Protocol. The activity of the proteinase K solution is 600 mAU/ml solution (or 40 mAU/mg protein). This activity provides optimal results in QIAamp protocols.

Purification on QIAamp Mini spin columns

The QIAamp DNA purification procedure comprises 4 steps and is carried out using QIAamp Mini spin columns in a standard microcentrifuge, on a vacuum manifold, or fully automated on the QIAcube (see page 15). The procedures are designed to ensure that there is no sample-to-sample cross-contamination and allow safe handling of potentially infectious samples.

QIAamp Mini spin columns fit into most standard microcentrifuge tubes. In the spin protocol, due to the volume of filtrate, 2 ml collection tubes (provided) are required to support the QIAamp Mini spin column during loading and wash steps. For the vacuum protocol, a vacuum manifold (e.g., QIAvac 24 Plus manifold; see Ordering Information, page 68) and a vacuum pump capable of producing a vacuum of –800 to –900 mbar are required. Eluted DNA can be collected in standard 1.5 ml microcentrifuge tubes (not provided).

Adsorption to the QIAamp membrane

The lysate buffering conditions are adjusted to allow optimal binding of the DNA to the QIAamp membrane before the sample is loaded onto the QIAamp Mini spin column. DNA is adsorbed onto the QIAamp silica membrane during a brief centrifugation or vacuum step. Salt and pH conditions in the lysate ensure that protein and other contaminants, which can inhibit PCR and other downstream enzymatic reactions, are not retained on the QIAamp membrane. If the initial sample volume is larger than 200 µl, it will be necessary to load the lysate onto the QIAamp Mini spin column in several steps. If larger sample volumes are required, we suggest using QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits (Midi: 1–2 ml; Maxi: 5–10 ml starting material).

Removal of residual contaminants

DNA bound to the QIAamp membrane is washed in 2 centrifugation or vacuum steps. The use of 2 different wash buffers, Buffer AW1 and Buffer AW2, significantly improves the purity of the eluted DNA. Wash conditions ensure complete removal of any residual contaminants without affecting DNA binding.

Elution of pure nucleic acids

Purified DNA is eluted from the QIAamp Mini spin column in a concentrated form in either Buffer AE or water. Elution buffer should be equilibrated to room temperature (15–25°C) before it is applied to the column. Yields will be increased if the QIAamp Mini spin column is incubated with the elution buffer at room temperature for 5 minutes before centrifugation. The eluted genomic DNA is up to 50 kb in length (predominantly 20–30 kb) and is suitable for direct use in PCR or Southern-blotting applications. If the purified DNA is to be stored, elution in Buffer AE (10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0) and storage at –20°C is recommended. If high pH or EDTA affects sensitive downstream applications, use water for elution. However, ensure that the pH of the water is at least 7.0 (deionized water from certain sources can be acidic). DNA stored in water is subject to degradation by acid hydrolysis.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 11/2007

Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin Protocol)

This protocol is for purification of total (genomic, mitochondrial, and viral) DNA from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, and body fluids using a microcentrifuge. For total DNA purification using a vacuum manifold, see “Protocol: DNA Purification from Blood or Body Fluids (Vacuum Protocol)” on page 30.

Important points before starting

- All centrifugation steps are carried out at room temperature (15–25°C).
- Use carrier DNA if the sample contains <10,000 genome equivalents (see page 18).
- 200 µl of whole blood yields 3–12 µg of DNA. Preparation of buffy coat (see page 19) is recommended if a higher yield is required.

Things to do before starting

- Equilibrate samples to room temperature.
- Heat a water bath or heating block to 56°C for use in step 4.
- Equilibrate Buffer AE or distilled water to room temperature for elution in step 11.
- Ensure that Buffer AW1, Buffer AW2, and QIAGEN Protease have been prepared according to the instructions on page 17.
- If a precipitate has formed in Buffer AL, dissolve by incubating at 56°C.

Procedure

1. Pipet 20 µl QIAGEN Protease (or proteinase K) into the bottom of a 1.5 ml microcentrifuge tube.

2. Add 200 µl sample to the microcentrifuge tube. Use up to 200 µl whole blood, plasma, serum, buffy coat, or body fluids, or up to 5 x 10⁶ lymphocytes in 200 µl PBS.

If the sample volume is less than 200 µl, add the appropriate volume of PBS. QIAamp Mini spin columns copurify RNA and DNA when both are present in the sample. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but not PCR. If RNA-free genomic DNA is required, 4 µl of an RNase A stock solution (100 mg/ml) should be added to the sample before addition of Buffer AL.

Note: It is possible to add QIAGEN Protease (or proteinase K) to samples that have already been dispensed into microcentrifuge tubes. In this case, it is important to ensure proper mixing after adding the enzyme.

3. Add 200 µl Buffer AL to the sample. Mix by pulse-vortexing for 15 s.

In order to ensure efficient lysis, it is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution. If the sample volume is larger than 200 µl, increase the amount of QIAGEN Protease (or proteinase K) and Buffer

AL proportionally; for example, a 400 μ l sample will require 40 μ l QIAGEN Protease (or proteinase K) and 400 μ l Buffer AL. If sample volumes larger than 400 μ l are required, use of QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits is recommended; these can process up to 2 ml or up to 10 ml of sample, respectively.

Note: Do not add QIAGEN Protease or proteinase K directly to Buffer AL.

4. Incubate at 56°C for 10 min.

DNA yield reaches a maximum after lysis for 10 min at 56°C. Longer incubation times have no effect on yield or quality of the purified DNA.

5. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

6. Add 200 μ l ethanol (96–100%) to the sample, and mix again by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid.

If the sample volume is greater than 200 μ l, increase the amount of ethanol proportionally; for example, a 400 μ l sample will require 400 μ l of ethanol.

7. Carefully apply the mixture from step 6 to the QIAamp Mini spin column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.*

Close each spin column in order to avoid aerosol formation during centrifugation. Centrifugation is performed at 6000 x g (8000 rpm) in order to reduce noise. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again at higher speed until the QIAamp Mini spin column is empty.

Note: When preparing DNA from buffy coat or lymphocytes, centrifugation at full speed is recommended to avoid clogging.

8. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μ l Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.*

It is not necessary to increase the volume of Buffer AW1 if the original sample volume is larger than 200 μ l.

* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 500 μ l Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min.

10. Recommended: Place the QIAamp Mini spin column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the old collection tube with the filtrate. Centrifuge at full speed for 1 min.

This step helps to eliminate the chance of possible Buffer AW2 carryover.

11. Place the QIAamp Mini spin column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Mini spin column and add 200 µl Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.

Incubating the QIAamp Mini spin column loaded with Buffer AE or water for 5 min at room temperature before centrifugation generally increases DNA yield. A second elution step with a further 200 µl Buffer AE will increase yields by up to 15%. Volumes of more than 200 µl should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the spin column will come into contact with the eluate, leading to possible aerosol formation during centrifugation. Elution with volumes of less than 200 µl increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield (see Table 5, page 26). For samples containing less than 1 µg of DNA, elution in 50 µl Buffer AE or water is recommended. Eluting with 2 x 100 µl instead of 1 x 200 µl does not increase elution efficiency. For long-term storage of DNA, eluting in Buffer AE and storing at –20°C is recommended, since DNA stored in water is subject to acid hydrolysis. A 200 µl sample of whole human blood (approximately 5 x 10⁶ leukocytes/ml) typically yields 6 µg of DNA in 200 µl water (30 ng/µl) with an A260/A280 ratio of 1.7–1.9.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, refer to pages 25–26 and Appendix A, page 51.

ANEXO B - Descrição da enzima *Hpy166II*

Hpy166II

Recognition Site:

5'...GTN[↓]NAC...3'
3'...CAN[↑]NTG...5'

Source:

A *E. coli* strain that carries the cloned *Hpy166II* gene from *Helicobacter pylori* J166 (M.J. Blaser).

Reagents Supplied:

NEBuffer 4

Enzyme Properties

Activity in NEBuffers:

NEBuffer 1: 100%

NEBuffer 2: 100%

NEBuffer 3: 50%

NEBuffer 4: 100%

When using a buffer other than the optimal (supplied) NEBuffer, it may be necessary to add more enzyme to achieve complete digestion.

Methylation Sensitivity:

dam methylation: Not sensitive

dcm methylation: Not sensitive

CpG methylation: Blocked by overlapping

More information about: Methylation Sensitivity

Heat Inactivation:

65°C for 20 minutes

Survival in a Reaction:

(+ + +) Suitable for an extended or overnight digestion. Enzyme is active > 8 hours.

More information about: Extended Digests with Restriction Enzymes.

Reaction & Storage Conditions

Reaction Conditions:

1X NEBuffer 4

Incubate at 37°C.

1X NEBuffer 4:

20 mM Tris-acetate

50 mM potassium acetate

10 mM Magnesium Acetate

1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

Unit Definition:

One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of pBR322 in 1 hour at 37°C in total reaction volume of 50 µl.

Concentration:

10,000 units/ml

Unit Assay Substrate:

pBR322 DNA

Storage Conditions:

10 mM Tris-HCl
250 mM NaCl
1 mM Dithiothreitol
0.1 mM EDTA
200 µg/ml BSA
50% Glycerol
0.15% Triton X-100
pH 7.4 @ 37°C

Storage Temperature:

-20°C

Diluent Compatibility:

Diluent C

Quality Control for Current Lot

Quality control values for a specific lot can be found on the datacard which accompanies each product.

Ligation and Re-cutting:

After a 10-fold overdigestion with Hpy166II, > 95% of the DNA fragments can be ligated with T4 DNA Ligase (at a 5' termini concentration of 1-2 µM) at 16°C. Of these ligated fragments, > 95% can be recut with Hpy166II.

16-Hour Incubation:

A 50 µl reaction containing 1 µg of DNA and 200 units of Hpy166II incubated for 16 hours at 37°C resulted in a DNA pattern free of detectable nuclease degradation as determined by agarose gel electrophoresis.

Exonuclease Activity:

Incubation of a 50 µl reaction containing 500 units of Hpy166II with 1 µg of a mixture of single and double-stranded [³H] *E. coli* DNA (10⁵ cpm/µg) for 4 hours at 37°C released < 0.1% of the total radioactivity.

Reagents Sold Separately

NEBuffer 4

ANEXO C - Descrição da enzima *BsrDI*

BsrDI

Recognition Site:

5'...GCAATGNN[▼]...3'
3'...CGTTAC[▲]NN...5'

Source:

Bacillus stearothermophilus D70 (Z. Chen)

Reagents Supplied:

NEBuffer 2

BSA

Enzyme Properties

Activity in NEBuffers:

NEBuffer 1: 50%

NEBuffer 2: 100%

NEBuffer 3: 50%

NEBuffer 4: 75%

When using a buffer other than the optimal (supplied) NEBuffer, it may be necessary to add more enzyme to achieve complete digestion.

Methylation Sensitivity:

dam methylation: Not sensitive

dcm methylation: Not sensitive

CpG methylation: Not sensitive

More information about: [Methylation Sensitivity](#)

Activity at 37°C:

30%

Heat Inactivation:

80°C for 20 minutes

Survival in a Reaction:

(+) Intermediate activity. Suitable for extended digestion, but < 8 hours.

More information about: [Extended Digests with Restriction Enzymes](#)

Reaction & Storage Conditions

Reaction Conditions:

1X NEBuffer 2

Supplemented with 100 µg/ml Bovine Serum Albumin

Incubate at 65°C.

1X NEBuffer 2:

10 mM Tris-HCl
1 mM Dithiothreitol
50 mM NaCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol
pH 7.9 @ 25°C

Unit Definition:

One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of λ DNA in 1 hour at 65°C in a total reaction volume of 50 µl.

Concentration:

2,000 units/ml

Unit Assay Substrate:

λ DNA

Storage Conditions:

10 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
1 mM Dithiothreitol
0.1 mM EDTA
200 µg/ml BSA
50% Glycerol
pH 7.6 @ 25°C

Storage Temperature:

-20°C

Diluent Compatibility:

Diluent A

Quality Control for Current Lot

Quality control values for a specific lot can be found on the datacard which accompanies each product.

Ligation and Re-cutting:

After a 10-fold overdigestion with BsrDI, > 95% of the DNA fragments can be ligated with T4 DNA Ligase (at a 5' termini concentration of 1-2 µM) at 16°C. Of these ligated fragments, > 95% can be recut with BsrDI.

16-Hour Incubation:

A 50 µl reaction containing 1 µg of DNA and 15 units of BsrDI incubated for 16 hours at 65°C resulted in a DNA pattern free of detectable nuclease degradation as determined by agarose gel electrophoresis.

Exonuclease Activity:

Incubation of a 50 μ l reaction containing 50 units of BsrDI with 1 μ g of a mixture of single and double-stranded [3 H] *E. coli* DNA (10^5 cpm/ μ g) for 4 hours at 65°C released < 0.1% of the total radioactivity.

Reagents Sold Separately

NEBuffer 2

BSA