

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

Defesa:

Joinville, 16 de abril de 2012

Membros da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho - Orientador

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França – Co-orientador

Prof. Dr. João Renato Rebello Pinho (USP)

Prof. Dr. Anderson Ricardo Roman Gonçalves (UNIVILLE)

Resumo:

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.