

Interferon gama: um gene-chave na defesa contra micobactérias

Viktoria Weihermann¹, Victor Cezar de Azevedo Pessini¹, Angelica Beate Winter Boldt²

¹ Graduandos do curso de Medicina, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

² Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

Autor para correspondência: angelicaboldt@gmail.com



O gene *IFNG* codifica o Interferon- γ (IFN- γ), molécula que exerce papel de destaque na defesa imunológica e atua como citocina, ativando células fagocíticas que destroem agentes invasores. Camundongos com a deleção do gene que codifica para o seu receptor, assim como a sua deficiência de IFN- γ , são muito mais susceptíveis a micobactérias e outros patógenos intracelulares. Sua expressão tem de ser estritamente regulada, para que a resposta proinflamatória não cause a destruição dos próprios tecidos. Esta regulação ocorre pela metilação do DNA na região promotora do gene, e por variantes alélicas, que modulam a afinidade por proteínas reguladoras. Dentre estas últimas, destaca-se uma variante intrônica, associada com a susceptibilidade à tuberculose e hanseníase, duas doenças que ainda representam, no Brasil, grave problema de saúde pública.

Imagine o corpo como um país, extenso e complexo. A pele e os epitélios seriam as fronteiras e limites dessa enorme nação; os vasos sanguíneos e linfáticos (assim como sangue e linfa) seriam as estradas e vias; os nervos e todo sistema nervoso corresponderiam à intrincada rede de comunicações. Nesse contexto, para garantir a proteção e integridade do organismo, o sistema imunológico surge como um exército de uma nação, protegendo o corpo contra ataques constantes e, assim, evitando o colapso de todo o sistema.

A resposta deste exército a substâncias normalmente estranhas ao organismo (**antígenos**) é chamada **resposta imunológica**, e se dá por meio de uma série de reações celulares e humorais (mediadas por **anticorpos**). Nessas reações, diversos tipos celulares são ativados e respondem de forma equivalente às ameaças encontradas. De imediato, as respostas imunológicas (Figura 1) podem ser classificadas como inatas ou adaptativas.

Antígenos - qualquer molécula que é reconhecida especificamente por um anticorpo.

Resposta imunológica refere-se a qualquer resposta desenvolvida por um organismo, a fim de protegê-lo de elementos invasores e células alteradas.

Anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Igs), são proteínas que compartilham uma estrutura geral, mas diferem em seis alças hipervariáveis, que se ligam especificamente a uma substância particular (seu antígeno).

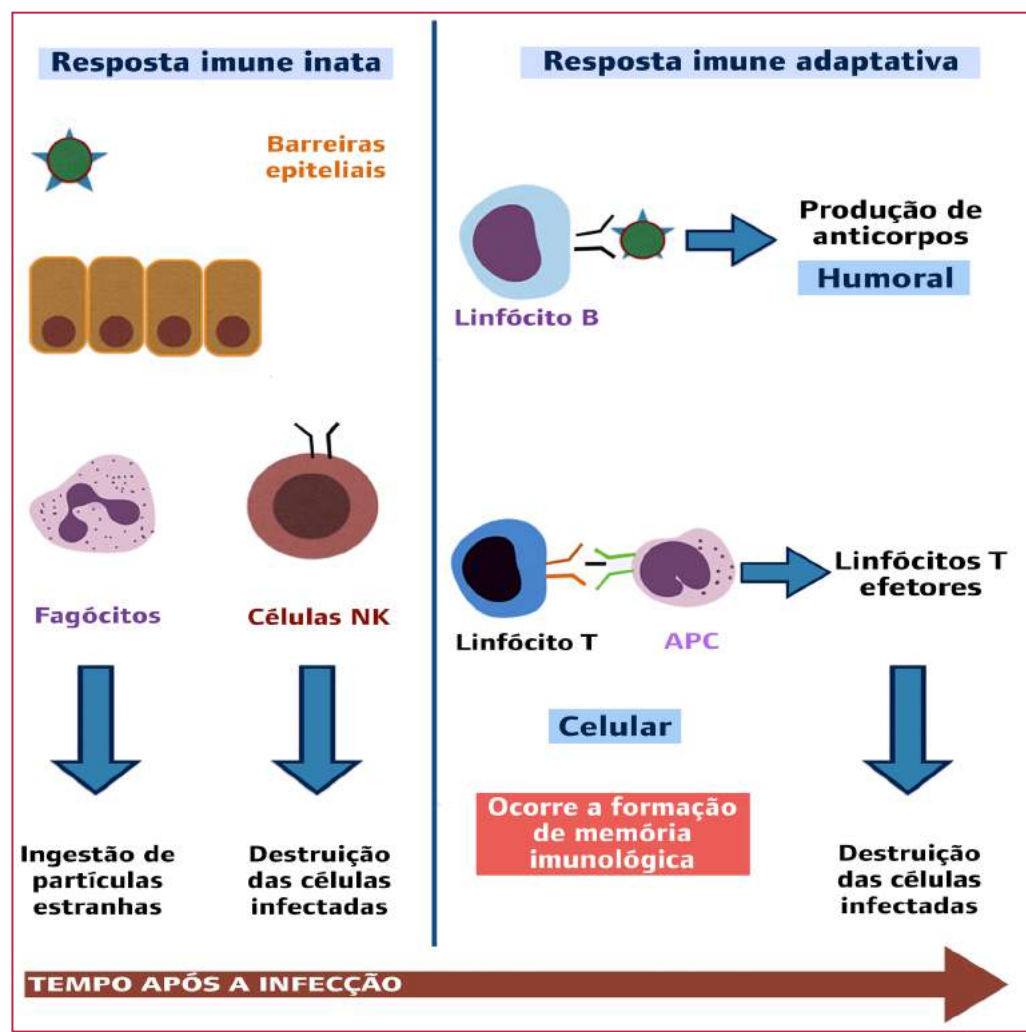


Figura 1. Respostas imunológicas. Nas respostas inatas, que ocorrem logo de início na infecção, o organismo não necessita de exposição prévia ao antígeno, para defender-se. Alguns mecanismos inatos são as barreiras físicas epiteliais que impedem a entrada de partículas estranhas, a atuação de fagócitos como os macrófagos, além da ação de células que destroem outras células infectadas, sem se valer da fagocitose, como as células NK. As respostas imunológicas adaptativas, por outro lado, ocorrem mais tarde, justamente por dependerem de exposição prévia ao antígeno a linfócitos T e B. Caracterizam-se por uma resposta específica a determinado antígeno, mediada por anticorpos e pela apresentação deste antígeno por uma APC (célula apresentadora de antígenos) a um linfócito, que se for citotóxico, destruirá as células alteradas, infectadas por um vírus ou de natureza tumoral, por exemplo.

Macrófagos - grandes células fagocitárias e migratórias, derivadas de precursores da medula óssea e presentes constitutivamente na maior parte dos tecidos, capazes de reconhecer e fagocitar patógenos e detritos, produzir citocinas pró-inflamatórias e apresentar antígenos aos linfócitos T.

Células NK, do inglês *Natural Killer* ou "assassinas naturais", estas células destroem células alvo alteradas (por exemplo, por infecções virais ou tumores), por meio da secreção de toxinas.

Nas respostas imunológicas inatas, o organismo não necessita de exposição prévia ao antígeno e combate as ameaças de forma inespecífica. Como exemplos, podemos citar as barreiras físicas formada pela pele e epitélios (que impedem a entrada de par-

tículas estranhas), defesas químicas (como pH reduzido), secreção de substâncias e a atuação de células fagocíticas, como os **macrófagos** e outros tipos de células capazes de destruir células alteradas, como as **células NK**.

Linfócitos - grupo de células brancas que, no caso dos linfócitos B e T, portam receptores de membrana codificados por segmentos gênicos rearranjados, capazes de se ligar a antígenos (moléculas reconhecidas por anticorpos).

Linfócitos T - linfócitos que se desenvolvem no timo e apresentam um receptor composto por duas cadeias diferentes (heterodimérico), através do qual interagem com outras células que lhes apresentem antígenos.

Citocinas - pequenas proteínas frequentemente secretadas por células de defesa, que atuam por meio de receptores em outras células, de modo a alterar o seu comportamento e regular sua função.

Mastócitos - células presentes em inúmeros epitélios e serosas que, quando estimuladas, liberam o conteúdo de grandes grânulos contendo mediadores de inflamação e reações alérgicas.

Imunoglobulina E (IgE) - anticorpo que interage com receptores presentes principalmente em mastócitos e basófilos, participando na resposta imunológica contra parasitas e nos processos alérgicos.

Células dendríticas - células brancas fagocitárias, especializadas na captura e apresentação de antígenos para linfócitos, e na produção de citocinas antivirais.

Já as respostas imunológicas adaptativas caracterizam-se por uma resposta específica a determinado antígeno, a qual é atingida a partir da ativação de **linfócitos T** e B. A partir da ativação dessas células, são desencadeados dois tipos de respostas imunológicas adaptativas: a resposta imunológica humoral e a celular. Na resposta humoral, os **linfócitos B** ativados secretam proteínas conhecidas como anticorpos, as quais irão se ligar aos antígenos, permitindo seu reconhecimento e destruição por outros tipos celulares. Na resposta celular, os **linfócitos T** exercem o papel principal, ao reconhecer e induzir a fagocitose de antígenos. Neste contexto, pode haver uma resposta celular do **tipo Th1** ou **Th2**, sendo o Interferon- γ a molécula-chave da resposta Th1. Assim, é interessante destacar que os linfócitos T se diferenciam pela expressão de genes que codificam **citocinas** características da diferenciação na direção de cada subtipo (ex.: Th1, Th2, etc). Na resposta Th1 (que envolve o linfócito Th1) a principal citocina produzida é o Interferon- γ , levando à ativação de macrófagos e células NK na defesa contra patógenos intracelulares. Já na resposta Th2, são produzidas diferentes citocinas, as quais levam à ativação de **mastócitos** e **eosinófilos**, bem como à produção do anticorpo **IgE** pelos linfócitos B. Trata-se de uma defesa utilizada para o combate de helmintos, por exemplo.

O IFN- γ NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Como integrante fundamental do exército imunológico, o IFN- γ é uma citocina membro da família do Interferons, proteínas solúveis originalmente identificadas em 1957 por sua capacidade de proteger células contra infecções virais. Esta importante molécula é responsável pela ativação de macrófagos, células que ingerem (fagocitam) patógenos e agentes externos, apresentando antígenos aos linfócitos T. O IFN- γ é produzido por linfócitos Th1, linfócitos T citotóxicos, células NK, bem como por **células apresentadoras de antígenos**, tais como macrófagos e **células dendríticas** (Figura 2).

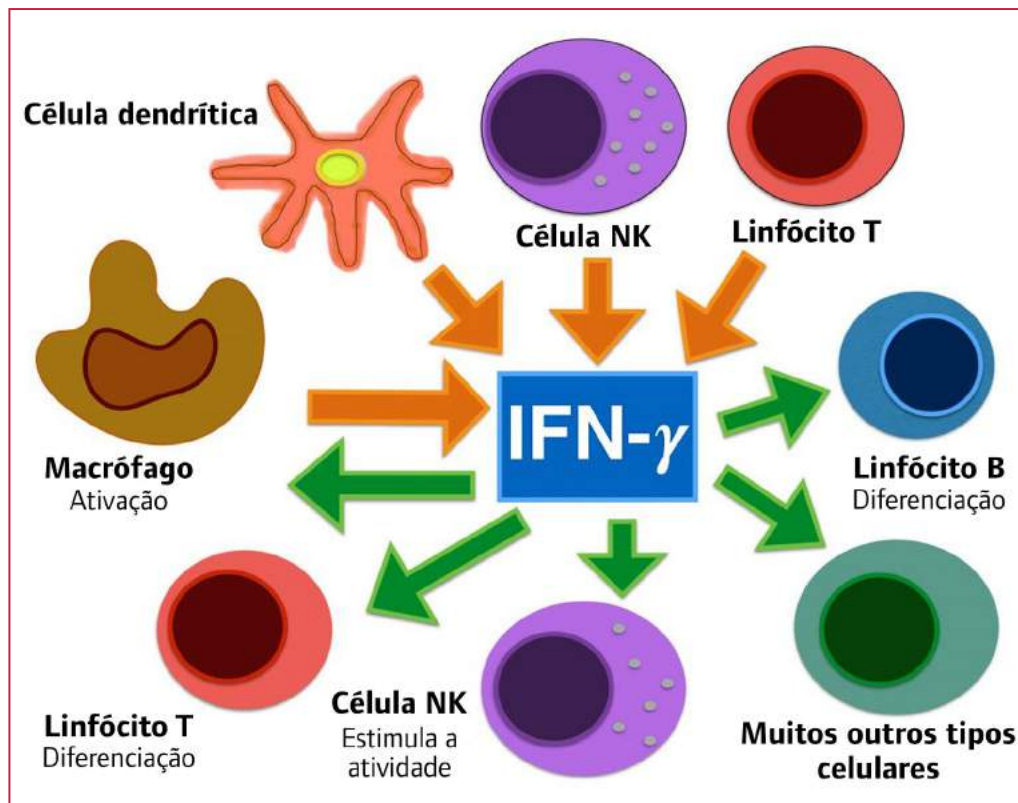
Linfócitos B - linfócitos que também atuam como APCs e que são capazes de sintetizar e secretar anticorpos, mediando a resposta imunológica humoral.

Resposta imunológica tipo Th1 - resposta de defesa mediada por um grupo de linfócitos T auxiliares, caracterizados por produzir citocinas que ativam células fagocitárias.

Resposta imunológica tipo Th2 - resposta de defesa mediada por um grupo de linfócitos T auxiliares, caracterizados por produzir citocinas que estimulam os linfócitos B, a secretarem anticorpos característicos da resposta alérgica e da defesa contra parasitas multicelulares.

Eosinófilos - células brancas fagocitárias, migratórias, com núcleo de dois lóbulos, múltiplos grânulos e funções antiparasitárias, cujo número aumenta muito em invasões por parasitas multicelulares e em reações alérgicas.

Células apresentadoras de antígenos (APCs) - células altamente especializadas que capturam e processam antígenos, apresentando seus fragmentos por meio de moléculas MHC de classe II para receptores de linfócitos T, a fim de ativá-los. Dentre as principais APCs, estão as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B.

**Figura 2.**

Principais tipos celulares associados ao IFN- γ . As setas laranjas indicam células responsáveis pela produção do IFN- γ . As setas verdes indicam as células nas quais o IFN- γ atua.

Complexo principal de histocompatibilidade

(MHC) - agrupamento de genes no braço curto do cromossomo 6, responsável por codificar glicoproteínas de membrana que apresentam peptídeos antigênicos a linfócitos T citotóxicos (MHC de classe I), ou linfócitos T auxiliares (MHC de classe II).

É interessante destacar, ademais, que a produção de IFN- γ por células apresentadoras de antígenos, atuando localmente, pode ser importante na ativação da própria célula, bem como de células vizinhas. Atualmente, sabe-se que a produção do IFN- γ é regulada por várias citocinas, entre as quais a interleucina 12 (IL-12), a qual estimula a produção do interferon.

O IFN- γ promove a ativação dos macrófagos e a diferenciação de linfócitos T; reforça a atividade antitumoral dos linfócitos T citotóxicos, aumentando a expressão de moléculas do **Complexo Principal de Histocompatibilidade** 1 e 2 (MHC I e MHC II), responsáveis por apresentar antígenos aos **linfócitos T citotóxicos** e **auxiliares**, respectivamente; auxilia no controle da diferenciação de linfócitos B, produtores de anticorpos; estimula a atividade das células NK e regula positivamente moléculas que têm efeito antiviral, antiproliferativo e que favorecem a morte celular programada (efeito pró-apoptótico).

Linfócito T citotóxico - tipo especializado de linfócito T que, após estimulação por um peptídeo antigênico, apresentado por moléculas MHC de classe I, é responsável por destruir células infectadas por patógenos intracelulares, como vírus.

Linfócito T auxiliar - tipo especializado de linfócito T (conhecido como Th, do inglês *T helper*) que, após estimulação por um peptídeo antigênico, apresentado por moléculas MHC de classe II, secretam citocinas, estimulando a ativação, diferenciação e proliferação de outras células de defesa.

Íntrons – regiões entre os éxons, que são removidas do transcrito de RNA primário e, portanto, não estão representadas no RNA maduro.

Região UTR, do inglês *untranslated*, sequência do mRNA que não é traduzida; geralmente, regula o momento, local e qualidade da iniciação da tradução e a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) no citoplasma.

Éxons correspondem às regiões presentes no transcrito após o processamento (mRNA).

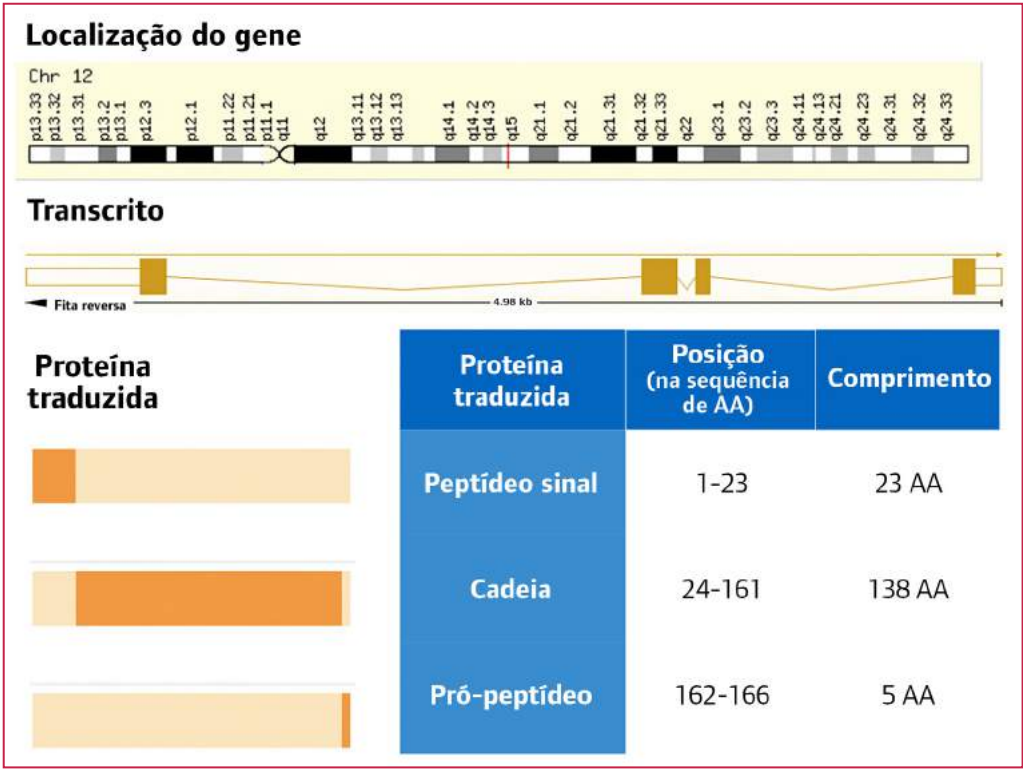
Camundongos, sem o gene que codifica o receptor para o interferon gama e células sem o gene *IFNG*, são muito mais susceptíveis a doenças causadas por micobactérias, assim como a outros patógenos.

O GENE *IFNG*

O gene que codifica o interferon gama na espécie humana está localizado na região 1, banda 5 do braço longo do cromossomo 12 (12q15). O gene *IFNG* contém 1218 pares de nucleotídeos organizados em 4 **éxons** e 3

íntrons. O primeiro éxon inicia por uma região não traduzida (**UTR**, do inglês *untranslated*) de 132 nucleotídeos, e o último éxon finaliza com uma UTR de 585 nucleotídeos. Os éxons codificam uma proteína precursora de 166 aminoácidos, a qual contém uma sequência sinal (peptídeo sinal) para secreção, composta por 23 aminoácidos. Esta sequência sinal e o pró-peptídeo de 5 aminoácidos são clivados na proteína madura, sendo o interferon gama composto, portanto, por 138 aminoácidos (Figura 3).

Figura 3. Principais informações sobre o gene *IFNG*. A primeira imagem mostra a localização cromossômica do gene *IFNG*, representada pela barra em vermelho. Retirada de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IFNG>. Já a segunda imagem mostra o transcrito. Os éxons são representados pelos retângulos coloridos; os íntrons são as linhas e as regiões não traduzidas (UTRs) correspondem aos retângulos vazios. Adaptado de: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000111537;r=12:68154768-68159747;t=ENST00000229135. A parte mais inferior da figura mostra a proteína traduzida. No lado esquerdo, está a representação gráfica das três regiões da proteína. No lado direito, a tabela indica o número de aminoácidos (AA) de cada região da proteína. Adaptado de: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01579>.



Além disso, o gene *IFNG* apresenta apenas um transcrito, o que é relativamente incomum (a maior parte dos genes transcreve múltiplos transcritos). Também apresenta alto grau de conservação evolutiva, com 46 **genes ortólogos**. Em outras palavras, mutações na sequência codificadora do

gene normalmente não são bem toleradas: alterações na sequência de aminoácidos deve afetar a atividade normal da proteína, tornando o indivíduo mais susceptível a diversas infecções intracelulares e afetando a sobrevivência até a idade reprodutiva da espécie.

Genes ortólogos – genes de duas espécies diferentes que derivam de um mesmo gene ancestral.

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *IFNG*

Como em todo bom exército, os diferentes componentes do agrupamento militar são treinados e designados para funções específicas. Nesse sentido, o gene *IFNG* é **pleiotrópico**, codificando uma molécula que atua em várias frentes, com as mais diferentes funções (SCHRODER *et al.*, 2004). Logo, sua expressão precisa ser estritamente regulada. Nesse sentido, a **metilação de citosinas** em dinucleotídeos 5'-CpG-3' (onde "p" representa o grupamento fosfato, ou seja, citosina seguida de guanina no sentido 5'-3') é um mecanismo eficiente para o silenciamento herdável, porém reversível, da expressão gênica (**mecanismo epigenético**). De fato, o gene *IFNG* apresenta uma frequência elevada de 5'-CpG-3' na região promotora,

responsável por parte de sua regulação. A importância da metilação desta "ilha" CpG para a expressão de *IFNG* é apoiada por experimentos com culturas de linfócitos T citotóxicos estimulados, na presença de 5-azacitidina (5-AZA). A 5-AZA é uma droga que provoca "desmetilação" do DNA. Após tratamento com AZA, níveis aumentados de interferon gama na cultura foram descritos, bem como um incremento no número de células inatas capazes de produzir IFN- γ (ARAÚJO-SOUZA *et al.*, 2015). Isso sugere que a metilação do gene *IFNG* é um determinante da produção de interferon gama. Sua produção tem de ser estritamente regulada, uma vez que assim como a sua deficiência aumenta a predisposição a infecções, seu excesso conduz à exacerbação da resposta inflamatória e danos nos próprios tecidos.

Gene pleiotrópico - gene único que influencia diversos traços fenotípicos.

Metilação de citosinas

- processo de adição de um grupo metil (-CH₃) em uma base nitrogenada citosina, precedendo uma guanina no sentido 5'-3', sendo representado como 5'CpG3' (onde "p" representa o grupamento fosfato do esqueleto açúcar-fosfato), e causa o silenciamento da expressão gênica.

Mecanismo epigenético

- mecanismo que causa modificações herdáveis, porém reversíveis, na expressão gênica, normalmente ao nível de compactação do DNA, sem alterar a sua sequência de bases nitrogenadas.

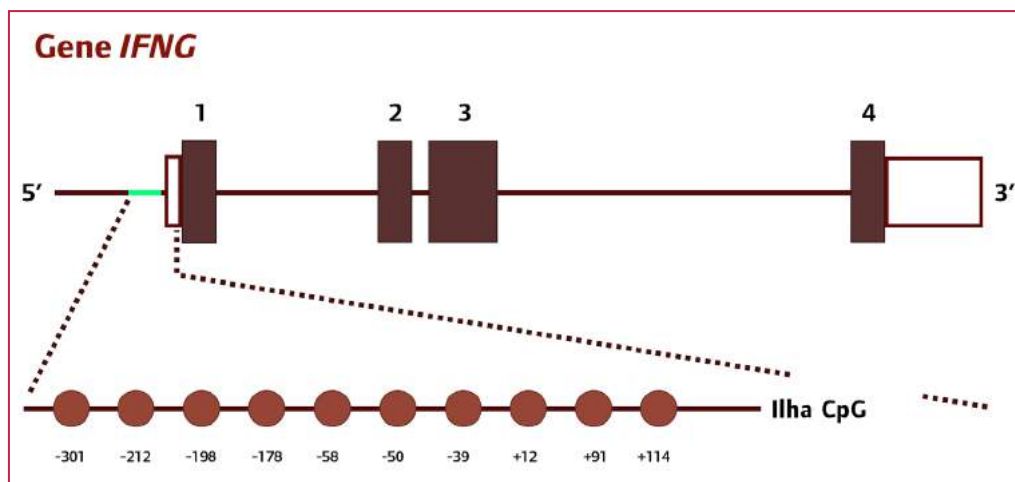


Figura 4.

Estrutura do gene *IFNG* e ilha CpG no promotor do gene no camundongo. Os exons estão representados pelos retângulos coloridos, numerados de 1 a 4. As regiões não traduzidas (UTR) a 5' e a 3' estão representadas como retângulos brancos, e o promotor, como uma linha verde. Em detalhe, estão indicadas as posições relativas dos dinucleotídeos 5'-CpG-3' localizados no promotor do *IFNG*. Os números correspondem à distância relativa (número de nucleotídeos) do local de início da transcrição. Adaptado de: ARAÚJO-SOUZA *et al.*, 2015.

Além da região promotora, os íntrons também estão associados com a regulação da expressão do gene. O polimorfismo +874 A>T do intron 1 de *IFNG* (g.68158742T>A) ocorre numa sequência reconhecida pela

proteína reguladora NFkB, que apresenta um importante papel na ativação de células da resposta imunológica. O alelo T tem sido associado à expressão aumentada de *IFNG* (revisto por SILVA *et al.*, 2014).

MUTAÇÕES NO INTERFERON GAMA E PATOLOGIAS

Atualmente, são notificados mais de 9,6 milhões de novos casos de tuberculose e mais de 215 mil novos casos de hanseníase por ano no mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> e <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/>). A tuberculose é provocada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, enquanto que a hanseníase é causada pelo *M. leprae* ou *M. lepromatosis*, micobactérias que invadem macrófagos. Indivíduos com produção deficiente de interferon gama são incapazes de restringir o crescimento dos bacilos, permitindo o estabelecimento da infecção. Por outro lado, indivíduos que apresentam alta expressão do gene *IFNG* (portadores do alelo +874T) apresentam resistência a estas doenças (CARDOSO *et al.*, 2010; revisão em SILVA *et al.*, 2014). Ademais, atualmente, o nível de IFN- γ também está sendo utilizado para diagnóstico da tuberculose, através do teste IGRA (*Interferon Gamma Release Assay*). Tal teste mede os níveis *in vitro* de interferon-gama, produzido por linfócitos T que tenham sido estimulados por antígenos do *M. tuberculosis*.

UM GENE, MUITAS FUNÇÕES...

Concluindo, o Interferon- γ é um integrante fundamental do nosso exército de defesa. Atuando nas mais diferentes frentes de batalha, este importante soldado mostra-se um valioso componente da resposta imunológica Th1, nos protegendo de ataques por agentes causadores de doenças. Mutações que alteram a expressão numérica deste soldado podem alterar grandemente a qualidade da resposta imunológica, aumentando a susceptibilidade ou a resistência a doenças importantes para a saúde pública, como a tuberculose e a hanseníase.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ARAÚJO-SOUZA, P. S.; HANSCHKE, S. C. H.; VIOLA, J. P. B. Epigenetic Control of Interferon-Gamma Expression in CD8+ T Cells. *Journal of Immunology Research*, v. 2015, p. 849573, 2015.
- CARDOSO, C. C. *et al.* IFNG+ 874 T > A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Human genetics*, v. 128, n. 5, p. 481-490, 2010.
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Imunobiologia de Janeway*. Porto Alegre: ArtMed, 7ª edição, 2010.
- SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gama: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.
- SILVA, G. A.; NAVECA, F. G.; RAMASAWMY, R.; BOECHAT, A. L. Association between the IFNG +874A/T gene polymorphism and leprosy resistance: A meta-analysis. *Cytokine*, v. 65, n. 2, p. 130-133, 2014.

PÁGINAS NA INTERNET

- ENSEMBL. IFNG (Interferon gama). Disponível em: <http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000111537;r=12:68154768-68159747;t=ENST00000229135>. Acesso em 15/09/2015.
- OMIM. *147570 INTERFERON, GAMMA; IFNG. Disponível em: <<http://omim.org/entry/147570?search=ifng&highlight=ifng>>. Acesso em: 05/02/2016.

