UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Subclonagem, expressão e avaliação da atividade biológica
do domínio extracelular da subunidade 2 do receptor do
interferon alfa

SUN-OK YOON

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Assoc. **MARIO HIROYUKI HIRATA**

São Paulo

2003

SUN-OK YOON

Subclonagem, expressão e avaliação da atividade biológica
do domínio extracelular da subunidade 2 do receptor do
interferon alfa

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Assoc. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/presidente

Profa. Dra. Kioko Takei
1^a. examinadora

Profa. Dra. Tânia Cristina Pithon Curi
2^a. examinadora

Profa. Assoc. Nancy Amaral Rebouças
3^a. examinadora

Profa. Dra. Rozangela Verlengia
4^a. examinadora

São Paulo, 28 de março de 2003

Ao meu Deus

*“ Porque dele, e
por meio dele, e
para ele são todas as cousas.
A ele, pois, a glória eternamente.
Amém.”*

*Aos meus pais Du-Ho Yoon e Km-Ryeo Yeo,
que mesmo distante sempre me apoiaram e
oraram por mim com amor sacrificial e
estão no meu coração.*

*Ao **Fred**, meu **esposo** sem igual,
pelo seu companheirismo, muito carinho, e
pela paciência na correção de português.
Sem ele seria quase impossível a realização deste trabalho...*

*À nossa **filhinha**, **Ana**,
o presente mais maravilhoso de Deus.*

*Ao Prof. Assoc. **Mario Hiroyuki Hirata**,
pela orientação incentivadora, pela paciência e
sobretudo pela sua simplicidade e coração aberto.*

*À Profa. Assoc. **Rosario Dominguez Crespo Hirata**,
pela co-orientação criteriosa, valiosas opiniões científicas e
apoio para a elaboração deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Diretor, Prof. Titular Jorge Mancini Filho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão de bolsa de estudos (Proc. 99/09492-4) que fez possível a realização deste trabalho, meu sincero obrigado.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Chefe, Profa. Titular Dulcinéia Saes Parra Abdalla.

À Profa. Dra. Primavera Borelli, ex-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia-Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Dra Nga Y. Nguyen do CBER, Food and Drug Administration, pelo fornecimento das células da linhagem Daudi utilizadas neste estudo

Ao National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), National Institutes of Health, EUA, pelo fornecimento do rIFN- α 2A utilizado neste estudo.

Ao Dr. David Gangemi da Universidade de Clemenson, EUA pelo fornecimento do rIFN- α 2b utilizado neste estudo.

Ao Dr. Oscar R. Colamonici da Universidade Illinois, EUA, pelo fornecimento de cDNA da subunidade 2c do receptor do interferon alfa utilizado neste estudo.

À Dra Ana Claudia R. da Silva do Instituto de Química, Universidade de São Paulo, pela colaboração técnica na expressão protéica em *E. coli* e pelo fornecimento do plasmídeo pAYCELES utilizado neste estudo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF - USP: Márcia Keila Nakamura, Fabiana Cristina Pereira, Hamilton Massayuki Hinuy, Selma A. Cavalli, Adriana Natsue Ozaki, Ivanise Moretti Rebecchi, Rosilene Fressati Cardoso, Vladimir Tavares, Carlos Eduardo de Melo, Bety Chen, Erika Miguel de Souza, Mustafa Hassan Issa, Patrícia Barco, Leonardo de Oliveira Matsumoto, Simone Cohen Sorkin, Alice Rodrigues, Francisco José Forestiero, Letícia Cecon, Marília Reis Gonçalves Rocha, André Ducat Luchessi, Leila Badreddini, Rafaela Picciotti, Edilson Pinheiro Gaspar, que proporcionaram momentos de descontração e que contribuíram, cada uma da sua maneira, para realização desse trabalho, muito obrigada!

Aos inesquecíveis amigos e colegas que passaram pelo Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF - USP: Elizabeth Cecília R. Guzmán, Luis Antonio Salazar, Heluih Atta Abdallah, Rozangela Verlengia, Marcos de Oliveira Machado, Andréa Luciana de Araújo Cunha, Katlin Brauer Massirer, Jo Osugue, Neuza Satomi Sato, Regina Celia Paschoal, Hemerson Bertassoni Alves, Silverio Teixeira dos Santos, Elaine Aparecida Magrini da Fonseca, Dárcio Matenhauer Lehrbach, Maria Fernanda Pimentel de Carvalho, pela força e amizade, muito obrigada.

Às Funcionárias da Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF - USP: Márcia Cristina Caramico, Sueli Providelo, Ana Maria Dantas e Maria Auxiliadora de Lima, pelo carinho e auxílio profissional.

Aos Funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Elaine Midory Ychico, Jorge Alves Lima e Benedita Espírito Santo de Oliveira, pelo seu carinho e auxílio profissional.

Às Funcionárias do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, Cláudia Luciano dos Reis, Carmen Lúcia Moura e Maria Dorlei Moura, pelo seu carinho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse à conclusão deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
bp	pares de base
BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar ao RNA
DMSO	dimetilsulfoxido
DNA	ácido desoxi-ribonucleico
dsRNA	RNA dupla fita
DTT	ditiotreitól
eIF	fator de iniciação na síntese de proteínas eucariotes
EMCV	vírus da encefalomiocardite
ECP	efeito citopático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>g</i>	unidade de aceleração da gravidade
GVHD	doença do hospedeiro versus enxerto
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
GST	glutathione-S-transferase
h	hora
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
huIFN- α	interferon alfa humano
IFN- α	interferon alfa
IFNAR	receptor do interferon tipo I
IFNAR1EC	domínio extracelular da subunidade 1 do receptor do interferon tipo 1
IFNAR 2	subunidade 2 do receptor do interferon tipo 1
IFNAR 2c	forma longa da subunidade 2 do receptor do interferon tipo 1
IFNAR2cEC	domínio extracelular da subunidade 2c do receptor do interferon tipo 1
IFN- β	interferon beta
IFN- γ	interferon gama
IL-2	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
IPTG	isopropil tio- β -D-galatosídeo
ISGF 3	fator de gene estimulado pelo interferon
ISRE	elemento responsivo pelo estímulo de interferon
IU	<i>International Units</i> (unidade internacional)
Jak	Janus quinase
kb	kilobase
kd	constante de dissociação
kDa	kiloDalton
LES	lupus eritematoso sistêmico
MHC	complexo de histocompatibilidade maior
min	minuto
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-[4,5-Dimetil tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo tiazolil azul

NZBWF 1	híbrido F1 do cruzamento de camundongos NZB/NZW
OAS	oligoadenilato sintetase
ovIFN- τ 4	interferon τ ovino
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PMSF	fenil metil sulfonil fluoreto
rIFN	interferon recombinante
rpm	rotação por minuto
RT	transcrição reversa
SBF	soro bovino fetal
Sd	subdomínios
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SH2	Src <i>homology</i> 2
STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
TA	temperatura ambiente
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
Tyk	tirosina quinase
V	volts

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Sistema Interferon	3
1.2. Interferon- α e Receptor do Interferon- α	5
1.3. Ligação do IFN- α ao receptor e sua sinalização	9
1.4. Atividades do IFN- α	10
1.5. IFN- α e doenças autoimunes	13
1.6. IFN- α e doença do hospedeiro versus enxerto (GVHD)	16
1.7. Agentes antagonistas de IFN- α	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Materiais	22
3.2. Métodos	24
4. RESULTADOS	53
4.1. Subclonagem do fragmento de DNA do IFNAR2cEC nos vetores de expressão pRSET A e pGEX 4T-2	53
4.2. Expressão da proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c (IFNAR2cEC) em <i>E. coli</i>	55
4.3. Isolamento da proteína recombinante de fusão GST-IFNAR2cEC	58
4.4. Estudo para obtenção da proteína solúvel	61
4.5. Coexpressão com chaperonina GroEL/ES	62
4.6. Purificação da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC	63
4.7. Clivagem da GST-IFNAR2cEC com trombina	63
4.8. Teste de sensibilidade das células de linhagem Daudi ao rIFN- α 2	66
4.9. Avaliação da atividade bloqueadora das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC sobre atividade antiproliferativa do rIFN- α 2	66
4.10. Titulação do vírus EMC por efeito citopático (ECP) nas células Hep 2/c	68
4.11. Teste de sensibilidade das células de linhagem Hep 2/c à atividade antiviral de rIFN- α 2	69
4.12. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC sobre atividade antiviral do rIFN- α 2	70
4.13. Estudo da expressão gênica do STAT 1 e da 2',5'-OAS pela RT-PCR nas células Daudi e Hep 2/c estimuladas com rIFN- α 2	72
4.14. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão gênica dos 2', 5'-OAS e STAT 1, utilizando células da linhagem Daudi e Hep 2/c	86
5. DISCUSSÃO	92
5.1. Subclonagem do fragmento de DNA do domínio extracelular da IFNAR 2c nos vetores de expressão pRSET A e pGEX 4T-2	92
5.2. Produção das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC	93
5.3. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiproliferativa do rIFN- α 2	96
5.4. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiviral do rIFN- α 2	97
5.5. Avaliação da expressão gênica da 2',5'-OAS e do STAT 1 por RT-PCR nas células Daudi e Hep 2/c estimuladas com diferentes concentrações de rIFN- α 2	99
5.6. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS, utilizando células da linhagem Daudi e Hep 2/c	101
6. CONCLUSÃO	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eventos celulares de indução, produção e ação do IFN.....	4
Figura 2. Estrutura <i>Ribbon</i> do complexo de IFN- α e IFNAR 2.....	9
Figura 3. Ligação e sinalização do IFN- α	9
Figura 4. Esquema ilustrativo da função das várias proteínas induzidas pelo IFN para atividade antiviral.....	11
Figura 5. Modelo de desenvolvimento da auto-imunidade.....	15
Figura 6. Mecanismo da ação do IFN- α na resposta imune da célula.....	16
Figura 7: Esquema das etapas realizadas para atingir o objetivo proposto.....	22
Figura 8. Seqüência codificadora da subunidade 2c do receptor do IFN- α	29
Figura 9. Esquema da subclonagem do domínio extracelular da IFNAR 2c (IFNAR2cEC) e transformação em <i>E. coli</i>	30
Figura 10. Esquema dos vetores da expressão pGEX 4T-2 e pRSET A.....	31
Figura 11. Esquema da purificação das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC e IFNAR2cEC.....	38
Figura 12. Fotografia do gel de agarose a 0,8 %, após a separação eletroforética e a coloração com brometo etídeo dos plasmídeos e do produto da PCR.....	54
Figura 13. Fotografia do gel de agarose a 0,8 % após a separação eletroforética e a coloração com brometo etídeo dos plasmídeos recombinantes pRSET-IFNAR2cEC (A) e pGEX-IFNAR2cEC (B).....	54
Figura 14. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5 % corado com Coomassie Blue para análise da expressão protéica do pRSET-IFNAR2cEC em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	56
Figura 15. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5 % corado com Coomassie Blue para análise da expressão protéica do pRSET-IFNAR2cEC em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	57
Figura 16. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5 % corado com Coomassie Blue para análise da expressão protéica do pGEX-IFNAR2cEC em <i>E. coli</i> DH5 α	58
Figura 17. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida 12,5 % corado com Coomassie Blue dos resultados do isolamento das proteínas recombinantes por sonicação.....	59
Figura 18. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12,5 % corado com Coomassie Blue dos resultados do isolamento da proteína recombinante por <i>French Press</i>	60

- Figura 19. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12,5 % corado com Coomassie Blue dos resultados do isolamento da proteína recombinante que foi obtida 3 hs após a indução com IPTG a 25 °C pelo kit BugBuster.....60
- Figura 20. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12,5 % corado com Coomassie Blue dos resultados do isolamento das proteínas recombinantes que foram coexpressas com a chaperonina GroEL/ES por sonicação..... 62
- Figura 21. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12,5 % corado com Coomassie Blue, para análise dos procedimentos de purificação das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC..... 63
- Figura 22. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5% corado com coomassie Blue (A e B) e do Imuno Blot, para análise de procedimentos de clivagem com trombina, utilizando a GST-IFNAR2cEC ligada na Glutathione-Sepharose.....65
- Figura 23. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5% corado com coomassie Blue (A e B), para análise de procedimentos de clivagem com trombina, utilizando a GST-IFNAR2cEC eluída da resina Glutathione-sepharose.....65
- Figura 24. Efeito de diferentes concentrações de rIFN- α 2 sobre a proliferação das células da linhagem Daudi..... 67
- Figura 25. Efeito da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiproliferativa de rIFN- α 2..... 68
- Figura 26. Titulação do vírus EMC por efeito citopático (ECP) nas células Hep 2/c.....69
- Figura 27. Efeito citopático do vírus EMC nas células da linhagem Hep2/c na presença de diferentes concentrações do rIFN- α 2 71
- Figura 28. Efeito da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiviral do rIFN- α 2..... 72
- Figura 29. Fotografia do gel de agarose a 1,5 % dos produtos da RT-PCR do gene STAT 1 obtidos a partir de 25, 27, 30, 35 e 40 ciclos de amplificação, cujo cDNA foi obtido pela RT de 0,4 μ g de RNA das células Daudi e Hep 2/c sem rIFN- α 2..... 74
- Figura 30. Fotografia do gel de agarose a 1,5 % dos produtos da RT-PCR do gene 2', 5'-OAS obtidos a partir de 25, 27, 30, 35 e 40 ciclos de amplificação, cujo cDNA foi obtido pela RT de 0,4 μ g de RNA das células Daudi e Hep 2/c sem rIFN- α 2..... 75
- Figura 31. Fotografia do gel de agarose a 1,5 % dos produtos da RT-PCR do gene GAPDH obtidos a partir de 20, 22, 25 e 27 ciclos de amplificação, cujo cDNA foi obtido pela RT de 0,4 μ g de RNA das células Hep 2/c sem rIFN- α 2..... 75
- Figura 32. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos da PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH nas células Hep 2/c..... 77

- Figura 33. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH com iniciadores do STAT 1 a 200 nM e iniciadores da GAPDH a 100 nM das células Hep 2/c..... 78
- Figura 34. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH com iniciadores do STAT 1 a 200 nM e iniciadores da GAPDH a 100 nM das células Daudi..... 79
- Figura 35. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH com iniciadores do STAT 1 a 200 nM e iniciadores da GAPDH a 50 nM das células Daudi..... 79
- Figura 36. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS e GAPDH com 32 ciclos de amplificação e a temperatura de hibridação 53 ° C das células Hep 2/c..... 81
- Figura 37. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS e GAPDH com 32 ciclos de amplificação e a temperatura de hibridação 55 ° C nas células Hep 2/c..... 82
- Figura 38. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS (200 nM de iniciadores) e GAPDH (100 nM de iniciadores) utilizando a temperatura de hibridação 55 ° C das células Daudi..... 83
- Figura 39. Comparação dos níveis de expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS na presença de diferentes concentrações de IFN- α 86
- Figura 40. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS e GAPDH, utilizando células Daudi..... 88
- Figura 41. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH, utilizando células Daudi..... 89
- Figura 42. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS e GAPDH, utilizando células Hep 2/c..... 90
- Figura 43. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH, utilizando células Hep 2/c..... 91
- Figura 44. Possíveis mecanismos ocorridos antes (A) e depois (B) da adição da GST-IFNAR2cEC para a expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS nas células Daudi e Hep 2/c..... 103

RESUMO

Foi produzida a proteína recombinante do domínio extracelular da subunidade 2 do receptor do IFN- α em forma de proteína de fusão com a glutathione-S-transferase (GST-IFNAR2cEC) em *E. coli*, com o objetivo de avaliar seu efeito bloqueador sobre a ação do IFN- α . A GST-IFNAR2cEC de forma solúvel, com peso molecular 54 kDa, foi obtida quando a proteína recombinante foi expressa a 25 ° C por indução de IPTG e foi lisada por *French Press*. A avaliação do efeito bloqueador da GST-IFNAR2cEC foi feita utilizando-se 3 métodos: 1) Ensaio antiproliferativo com células Daudi, 2) ensaio antiviral com células Hep 2/c e vírus encefalomiocarditis, e 3) expressão gênica semi-quantitativa do STAT 1 (transdutor de sinal e ativador de transcrição) e da 2', 5'-oligoadenilato sintetase (OAS) pela RT-PCR duplex nas células Daudi e Hep 2/c. A GST-IFNAR2cEC, mesmo a 420 nM, não inibiu as atividades antiproliferativa e antiviral de 24,5 pM e 49 pM de rIFN- α 2 provavelmente devido à sua ineficiência na competição com o IFNAR da superfície celular durante o longo período de incubação nos ensaios realizados. A expressão gênica do STAT 1 não foi inibida pela GST-IFNAR2cEC nas células Daudi e Hep 2/c, porém inibiu-se a da 2', 5'-OAS. Estes resultados sugerem que a expressão gênica do STAT 1 é independente da ligação do IFN- α com a IFNAR 2c, e que a da 2', 5'-OAS é dependente dessa ligação nessas células

ABSTRACT

We have produced the recombinant protein comprising the extracellular domain of the human type I interferon receptor 2c subunit as a fusion protein with glutathione-S-transferase (GST-Ifnar2cEC) in *E. coli*, with the aim of evaluate its blocking effect against interferon- α activity. The soluble recombinant protein GST-Ifnar2cEC (54 kDa) was obtained under IPTG induction at 25 ° C and cell disruption by French Press. Three methods were employed for evaluation of blocking effect of the GST-Ifnar2cEC: 1) antiproliferative assay on Daudi cells, 2) antiviral assay on Hep 2/c cells challenged by encephalomyocarditis virus and 3) mRNA semi-quantification of STAT 1 (signal transducer and activator of transcription) and of 2', 5'-oligoadenylate synthetase in duplex RT-PCR on Daudi and Hep 2/c cells. The GST-Ifnar2cEC even with 420 nM did not inhibit antiproliferative and antiviral activity of 24.5 pM and 49 pM of IFN- α 2 probably due to its inefficiency in binding competition with IFNAR membrane-anchored receptor during the long period of incubation in the realized assays. The mRNA expression of STAT 1 wasn't inhibited by GST-Ifnar2cEC on Daudi and Hep2/c, while the mRNA expression of 2', 5'-OAS was inhibited. These results suggest that the mRNA expression of STAT 1 is independent on binding of IFN- α to IFNAR 2c, and that the of 2', 5'-OAS is dependent on this binding on these cells.

1. INTRODUÇÃO

Os interferons (IFNs) são glicoproteínas celulares regulatórias pertencentes à família das citocinas e fazem parte do sistema de defesa natural do organismo. Os IFNs são produzidos pelas células, em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo ácidos nucleicos virais, células estranhas, particularmente as células neoplásicas, antígenos de bactérias, de protozoários e de vírus (BARON *et al.*, 1992).

Estudos baseados em estrutura-função e de “competição-cruzada” de ligação com receptores permitiram classificar os IFNs em : tipo I (α , β , e ω) e tipo II (γ). Os IFNs $-\alpha$, $-\beta$, e $-\omega$ compartilham um receptor comum, denominado receptor do IFN tipo I (IFNAR) enquanto que o IFN- γ possui um receptor próprio (receptor do IFN tipo II) (PFEFFER *et al.*, 1998).

As atividades biológicas características do IFN- α decorrem de ligações de alta afinidade a um receptor específico (IFNAR) na superfície celular e posterior indução da síntese de proteínas efetoras. Existem duas subunidades funcionais do IFNAR: IFNAR 1 e IFNAR 2c.

As atividades biológicas do IFN- α que estão bem estabelecidas até o momento, são a imunorregulatória, a antiproliferativa e a antiviral. Devido a essas atividades, o IFN- α está sendo cada vez mais utilizado clinicamente para tratamento de infecções virais (hepatite B e hepatite C) e de câncer (leucemia pilosa, leucemia mielóide crônica, condiloma, sarcoma de Kaposi, linfoma de células T e B, melanomas, mielomas e carcinoma de células renais) (PFEFFER *et al.*, 1998).

Por outro lado, o IFN- α está envolvido em certas doenças autoimunes e no aparecimento dessas doenças após seu uso terapêutico (HERMANS & BILLIU, 1989, RONNBLOM *et al.*, 1991, GUERCI *et al.*, 1994). Essas evidências sugerem que o IFN- α sem dúvida participa na patogênese dessas doenças, possivelmente causando a produção de autoanticorpos.

Para esclarecimento do papel do IFN- α e a pesquisa sobre possíveis condutas terapêuticas nessas doenças, têm sido conduzidos estudos de inibidores de IFN- α na forma de anticorpos e proteínas recombinantes do domínio extracelular da subunidade 1 do IFNAR (IFNAR 1), mostrando resultados promissores (BENOIT *et al.*, 1993, LU *et al.*, 1998). Porém esses inibidores apresentam pouca eficácia de inibição porque o IFN- α tem 12 subclasses e baixa afinidade com a IFNAR 1 (NGUYEN *et al.*, 1996, YOON *et al.*, 2000). Além disso, xenoanticorpos anti-IFN- α e xenoanticorpos anti-IFNAR 1 podem induzir a resposta imune do paciente.

Recentemente, tem-se observado que a subunidade 2c do receptor do IFN- α (IFNAR 2c) tem alta afinidade com o IFN- α . Isto sugere que a proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c pode ser um bom inibidor da ação do IFN- α .

Com base nessas informações, no presente estudo, produziu-se a proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c em *E. coli* para o seu uso como antagonista do receptor do IFN- α . Avaliou-se a inibição da atividade do IFN- α por essa proteína recombinante *in vitro* através dos testes antiviral e antiproliferativo. Foi avaliada também a atividade bloqueadora da proteína recombinante na expressão gênica do STAT 1 (Transdutor de sinal e ativador de transcrição) e da 2',5'-Oligoadenilato sintetase, que são estimulados pelo IFN- α . A avaliação da expressão gênica na presença ou na ausência do IFN- α e da proteína recombinante pode esclarecer mais especificamente o mecanismo de ação do IFN- α e do bloqueio da proteína recombinante sobre atividade do IFN- α .

1.1. O Sistema Interferon

O IFN foi descoberto quando observou-se que a membrana de embrião de galinha incubada com vírus influenza inativado por calor, produzia uma substância que conferia à nova membrana uma resistência à infecção por vírus (ISAACS & LINDENMANN, 1957). O IFN pertence à família das citocinas que participam no controle e na replicação celular e na defesa do hospedeiro contra organismos estranhos, como vírus ou bactérias. Embora o IFN tenha sido inicialmente conhecido pela propriedade antiviral, numerosas investigações posteriores mostraram que o IFN está envolvido na regulação do crescimento celular e no efeito imunomodulatório (Tabela 1, BARON *et al.*, 1992).

Tabela 1. Principais ações biológicas de Interferon

Atividade antiviral
Atividade antitumoral
Inibição de crescimento celular
Alteração de membrana celular
Atividade imunoregulatória
Ativação de macrófago
Aumento de citotoxicidade de linfócitos
Regulação de oncogenes
Interação hormonal
Diferenciação celular

(Adaptado de BARON *et al.*, 1992)

A produção inicial ou a administração do IFN exógeno não protege o hospedeiro diretamente, mas age via receptores específicos das células, ativando determinados sistemas que propagam sinais ao núcleo e induzem a expressão dos genes que codificam várias proteínas que promovem as ações defensivas (BRANCA, 1988, GROSSBERG *et al.*, 1989). A figura 1 mostra a indução, propagação do sinal e ativação das proteínas efetoras.

Figura 1. Eventos celulares de indução, produção e ação do IFN (Adaptado de BARON & DIAZANI, 1994). Os indutores do IFN interagem com as células, ativando os genes do IFN, seguido da produção do mRNA para IFN. O mRNA é traduzido e o IFN é secretado para o fluido extracelular onde interage com receptor na membrana das células produtoras ou células ativadas. As células estimuladas pelo IFN ativam os genes que codificam proteínas efetoras, as quais estabelecem resistência antiviral e a alteração de outras células. As células ativadas estimulam células vizinhas para então produzir proteínas efetoras.

A tabela 2 resume as características básicas do IFN humano (KONTSEK, 1994, PESTKA, 2000). Entre o IFN tipo I classifica-se o IFN- α , - β e - ω baseando-se na propriedade imunogênica e na seqüência de aminoácidos e sendo geralmente estável em pH-ácido. O IFN- α e o IFN- ω podem ser induzidos por células alogênicas, células infectadas por vírus, células tumorais, bactérias, envelopes virais que estimulam linfócitos B, células NK, e macrófagos. O IFN- β é induzido por ácido nucléico de vírus e outros microorganismos que infectam células, como por exemplo: fibroblastos, células epiteliais, e macrófagos. O IFN- α e o IFN- ω são produzidos pelos leucócitos, enquanto que o IFN- β é produzido por fibroblastos. O IFN tipo II também é denominado de IFN- γ ou IFN imune. Ele é instável em meio ácido e é induzido por linfócitos T estimulados por antígenos estranhos; sendo produzido principalmente por células T ativadas e células NK.

Tabela 2. Gene dos IFNs humanos e as suas proteínas

	Tipo I	Tipo II
Nomes	α : Leucócito β : Fibroblasto ω : Trofoblasto (TP-1)	γ : Imune
Genes funcionais	Braço curto, cromossomo 9 Não tem íntrons α : 14 genes distintos que codificam 12 proteínas diferentes β : 1 gene ω : 1 gene	Braço longo Cromossomo 12 3 íntron 1 gene
Proteínas	α : Proteína de 165 a 166 aa algumas subclasses são glicosiladas Monômero funcional β : Proteína de 166 aa N-glicosilada 28 % de identidade de aa com IFN- α Monômero funcional ω : Proteína de 172 a 174 aa N-glicosilada Monômero funcional (provável) 60 % de identidade de aa com IFN- α 30 % de identidade de aa com IFN- β	Proteína de 146 aa N-glicosilada Homodímero funcional
Receptores	Cromossomo 21q Consiste em duas subunidades: IFNAR 1 e IFNAR 2 IFNAR 2 tem 3 formas de transcritos: longa (2c), curta (2b) e solúvel (2a)	Cromossomo 6 Consiste em duas subunidades: IFNGR 1 e IFNGR 2

Adaptado de SAMUEL, 1991, KONTSEK, 1994 e PESTKA, 2000

1.2. Interferon- α e Receptor do Interferon- α

O IFN- α humano é produzido predominantemente por leucócitos do sangue periférico (CANTELL & HIRVONEN, 1978) e por várias linhagens celulares induzidas por vírus, como Namalwa e KG-1 (ZOON *et al.*, 1978, ZOON *et al.*, 1979, JOHNSTON, 1980). O IFN- α foi purificado pela primeira

vez no final da década de 70, por meio de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), cromatografia de afinidade com imunoadsorvente e SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). A capacidade de purificar e caracterizar o IFN- α natural é um desafio, já que o IFN- α humano representa uma família de 12 subclasses de glicoproteínas semelhantes em sua estrutura (KONTSEK, 1994, PESTKA, 2000).

Embora o peso molecular dos diferentes IFNs- α varie de 16 a 27 kDa, a caracterização das proteínas e experimentos de clonagem sugerem que haja um único polipeptídeo de 165 a 166 aminoácidos em cada uma das subclasses do IFN- α . As diferenças no peso molecular podem ser devidas a modificações pós-tradução, glicosilação ou influência estrutural na migração dos componentes em SDS-PAGE. Por exemplo, a maioria dos IFNs- α tem 4 cisteínas em sua estrutura, mas os IFNs- $\alpha 1$, - αD e - $\alpha 13$ têm 5 cisteínas

O IFN- α age por meio de ligação com o receptor do IFN tipo I (IFNAR) na superfície das células. O gene do IFNAR está localizado no cromossomo 21q e o número de receptores por célula varia de 100 a 5000 (LANGER & PESTKA, 1988). Existem duas subunidades funcionais do IFNAR: IFNAR 1 e IFNAR 2. Uzé e cols (1990) clonaram o cDNA da subunidade 1 do IFNAR (IFNAR 1), que codifica uma proteína de 557 aminoácidos, sendo 25 aminoácidos do peptídeo sinalizador (1-25), 411 aminoácidos do domínio extracelular (26-436), 21 aminoácidos do domínio transmembrana (437-457) e 100 aminoácidos do domínio citoplasmático (458-557). A IFNAR 1 sofre glicosilação extensiva, tendo peso molecular de 120 a 130 kDa em eletroforese de gel de poliacrilamida. A IFNAR 1 tem baixa afinidade com IFN- α ($k_d \geq 100$ nM para IFN- $\alpha 2$) (LING *et al.*, 1995, NGUYEN *et al.*, 1996, LIM *et al.*, 1994).

A subunidade 2 (IFNAR 2) tem três formas: forma solúvel, forma curta e forma longa. Ela foi isolada pela primeira vez da urina humana e foi identificada como um receptor solúvel de IFN α/β de 40 kDa (p40). Essa forma solúvel é denominada IFNAR 2a (NOVICK *et al.*, 1994). Esse p40 corresponde ao domínio extracelular do receptor de 51 kDa que é a forma curta da IFNAR 2. Essa subunidade de forma curta é denominada IFNAR 2b. Para construção de uma biblioteca de cDNA da IFNAR 2b, Novick e cols.

(1994) extraíram RNA total de células das linhagens Daudi e WISH. O cDNA de 1,5 kb da IFNAR 2b codifica 331 aminoácidos. A produção da IFNAR 2b é feita por processamento alternativo do mRNA do gene da IFNAR 2. A IFNAR 2b se liga com o IFN tipo I, mas não pode formar o complexo funcional quando associada com a IFNAR 1 (COLAMONICI *et al.*, 1994, DOMANSKI *et al.*, 1995). Domanski e cols. (1995) relataram a forma longa da IFNAR 2 como uma proteína de 95 a 100 kDa. Essa forma longa é denominada IFNAR 2c. Para biblioteca de cDNA, eles extraíram mRNA de células da linhagem U266. O cDNA de 2.636 bp da IFNAR 2c codifica 515 aminoácidos. A IFNAR 2c se liga com o IFN tipo I com alta afinidade (ex., $k_d \sim 2-8$ nM para IFN- α_2), sendo o componente principal para ligação com o IFN tipo I, e medeia a sinalização funcional quando associada com IFNAR 1 (DOMANSKI *et al.*, 1995, CUTRONE & LANGER, 1997). A IFNAR 2b e a IFNAR 2c têm os mesmos domínios extracelulares (aminoácidos 1-243) e transmembrana (244-264), mas têm domínios citoplasmáticos diferentes {IFNAR 2b (265-331) e IFNAR 2c (265-515)}.

Trabalhos recentes mostraram que as subunidades IFNAR 1 e IFNAR 2c contribuem para a formação de uma estrutura adequada para ligação com o IFN- α , sendo a IFNAR 1 um modulador da afinidade do receptor que tem baixa afinidade quando está sozinha, enquanto que a IFNAR 2c tem papel crítico e alta afinidade na ligação com o IFN- α (COHEN *et al.*, 1995, DOMANSKI *et al.*, 1995, CUTRONE & LANGER, 1997).

A estrutura do receptor cristalizado mostrou que a IFNAR pertence à classe II de receptores de citocinas (*helical cytokine receptor family - hCRII*) juntamente com receptor do IFN- γ (WALTER *et al.*, 1995). Baseando-se na semelhança da seqüência entre as citocinas de classe II, Uzé e cols. (1995) avaliaram que o domínio extracelular da IFNAR 2 é formado por dois subdomínios (sd) de mais ou menos 100 aminoácidos (sd 100A e sd 100B) e cada um deles forma um β -hélice. Com esse modelo suposto, recentemente Lewerenz e cols. (1998) criaram proteínas mutadas, as quais são feitas pela substituição de um aminoácido por alanina no domínio extracelular da IFNAR 2. Os autores sugeriram que a mutação do aminoácido metionina na posição 73 (M73) causa instabilização da estrutura do sd 100A e a mutação

dos aminoácidos T71-M73-K75 do sd 100A causa a destruição do sítio de ligação do receptor, resultando na perda de atividade do IFN- α . Também mostraram que o sítio de ligação da IFNAR 2 é diferente para o IFN- α e para o IFN- β . No entanto, ainda não se sabe como cada um desses subdomínios contribuem para ligação com o IFN tipo 1.

Lu e cols. (1998) produziram 5 anticorpos monoclonais contra a IFNAR 1 que reconhecem epítomos diferentes. Avaliaram a inibição do IFN- α (IFN- α 2/1, - α 1, - α 2, - α 5 e - α 8) por esses anticorpos utilizando teste antiviral e a formação de ISGF 3 (fator de gene estimulado pelo interferon). O anticorpo monoclonal 2E1, que é o inibidor de IFN- α mais potente entre os 5 anticorpos monoclonais, necessitou dos dois domínios (domínio 1 e 2) da IFNAR 1 para ser reconhecido pelo epítomo. Porém, o anticorpo 2E1 não inibiu a atividade do IFN- β , mostrando que os sítios de ligação para IFN- α e IFN- β são diferentes. Portanto, essas ligações diferentes podem causar sinalizações distintas para estabelecer atividades exclusivas para cada classe do IFN tipo I.

Piehl & Schreiber (1999) identificaram 3 aminoácidos (T46, I47 e M48) da IFNAR 2 como pontos críticos na interação entre ligante e receptor. Piehl e cols. (2000) identificaram 6 aminoácidos (L30, R33, R144, A145, M148 e R149) do IFN- α 2 como sítios de ligação ao seu receptor. Baseados nesses estudos, Roisman e cols (2001) estudaram a estrutura do complexo IFN- α -IFNAR 2, sugerindo interações possíveis entre aminoácidos críticos, dentre os quais estão os aminoácidos citados acima (Figura 2). Estudos dessa natureza podem vir a elucidar a estrutura-função da IFNAR 1 e IFNAR 2 e as diferenças de afinidade entre várias classes do IFN tipo I.

Figura 2. Estrutura *Ribbon* do complexo de IFN- α e IFNAR 2 (ROISMAN *et al.*, 2001). Os 10 resíduos de aminoácidos contribuem na ligação do IFN- α à IFNAR 2. Os números pretos e vermelhos são aminoácidos cruciais do IFN- α e da IFNAR 2 respectivamente.

1.3. Ligação do IFN- α ao receptor e sua sinalização

A ligação do IFN- α a seus receptores desencadeia uma cascata de reações intracelulares, envolvendo a fosforilação de resíduos de tirosina, como é possível observar na figura 3.

Figura 3. Ligação e sinalização do IFN- α (Adaptado de PESTKA, 2000). A ligação do IFN- α às subunidades do IFNAR, IFNAR 1 e a IFNAR 2c inicia uma cascata de sinalização.

Ao ligar-se ao receptor, o IFN- α desencadeia a fosforilação de 2 membros da família da JAK (*Janus* quinase): a tirosina quinase 2 (Tyk 2) e a Janus quinase 1 (Jak 1). Essas quinases ativas são mediadoras da fosforilação dos resíduos de tirosina das subunidades IFNAR 1 e IFNAR 2c respectivamente. Após a fosforilação do receptor, ocorre a fosforilação do STAT 1 e do STAT 2 (Transdutor de sinal e ativador de transcrição) e a seguir o heterodímero fosforilado STAT 1-STAT 2 combina-se com outra proteína citoplasmática denominada p48, para formar o complexo ISGF 3. Este complexo é rapidamente translocado para o núcleo e se liga ao ISRE (elemento responsivo pelo estímulo de interferon), presente nas regiões regulatórias de genes induzidos pelo IFN- α , para iniciar a transcrição. A seguir, esses genes são traduzidos para proteínas efetoras tais como: a proteína quinase R (PKR), a 2', 5'-oligoadenilato sintetase (2', 5'-OAS), a proteína GTPase Mx e outras (PLATANIAS *et al.*, 1994, ABRAMOVICH *et al.*, 1994, CONSTINESCU *et al.*, 1995, COLAMONICI *et al.*, 1994, LI *et al.*, 1997, PESTKA, 2000).

1.4. Atividades do IFN- α

1.4.1. Atividade antiviral

A atividade antiviral é a função mais conhecida do IFN- α . As proteínas antivirais produzidas em resposta ao IFN- α são a proteína quinase R dependente de dsRNA (RNA dupla fita), a 2', 5'-oligoadenilato sintetase, a proteína Mx e os antígenos de MHC I e II. Elas agem na inibição da adesão do vírus à membrana celular, na inibição da penetração e transcrição virais e inibição da tradução e síntese protéica (SAMUEL, 2001) (Figura 4). A quinase PKR inibe a tradução inicial através da fosforilação do fator de iniciação na síntese de proteína (eIF-2 α). A PKR atua também na remoção da infecção viral por intermédio de apoptose diretamente (DER *et al.*, 1997, KING & GOODBOURN, 1998, TANAKA *et al.*, 1998) ou indiretamente induzindo a síntese de Fas e receptor de Fas (FUJIMOTO *et al.*, 1998). O

sistema oligoadenilato sintetase (OAS) - nuclease RNase L degrada RNA viral. A proteína Mx é uma proteína GTPase, que se liga ao nucleocapsídeo do vírus no citoplasma da célula e bloqueia a migração do vírus para o núcleo das células (GOODBOURN *et al.*, 2000). A ADAR modifica dsRNA por deaminação de adenosina, tornando-a inosina. O antígeno MHC (complexo de histocompatibilidade maior) contribui para atividade antiviral do IFN através do aumento da ação lítica dos linfócitos T citotóxicos.

Figura 4. Esquema ilustrativo da função das várias proteínas induzidas pelo IFN para atividade antiviral (Adaptado de SAMUEL, 2001). Entre as proteínas induzidas, a quinase PKR, o sistema oligoadenilato sintetase (OAS) - nuclease RNase L, a proteína GTPase Mx e ADAR (adenosina deaminase) são proteínas que afetam a multiplicação de vírus dentro de uma única célula. Além disso, através da interação de várias células, como por exemplo, células NK e células T com células infectadas, a expressão de antígeno MHC aumenta, resultando no aumento da defesa do hospedeiro contra o vírus.

1.4.2. Atividade antitumoral

O IFN- α é produzido em resposta à presença de tumores e inibe a proliferação das células tumorais de maneira direta ou mediante a ativação das células citotóxicas do sistema imune do hospedeiro, tais como linfócito T, a célula NK e o macrófago ativado (BARON *et al.*, 1992). O IFN- α também participa da regulação da diferenciação celular, sendo este efeito a base da

terapia da leucemia pilosa, anomalia que é causada por um bloqueio na diferenciação das células mielóides em fase de maturação.

1.4.3. Atividade imunorregulatória

O IFN- α exerce atividades regulatórias sobre o sistema imune, tais como: aumento da expressão do antígeno de MHC classe I, aumento da expressão de receptores de Fc, aumento da produção de anticorpos por maturação de células B, ativação de macrófago, aumento da atividade de células NK, aumento da produção de IL-1 e TNF por macrófagos e monócitos e aumento de citotoxicidade (De MAEYER & De MAEYER-GUIGNARD, 1994, HERBERMAN, 1997) (Tabela 3).

Com base nessas atividades biológicas, o IFN- α é utilizado em cerca de 40 países para tratamento de mais de 14 tipos de câncer e de infecções virais, incluindo melanoma, condiloma, sarcoma de Kaposi, hepatite B e, hepatite C (PFEFFER *et al.*, 1998).

Tabela 3. Efeitos do IFN- α no sistema imune

Aumento de antígenos de membrana, especialmente MHC classe I e molécula de adesão nas células tumorais e células efetoras
Promoção de diferenciação de linfócitos
Ativação de células efetoras
Aumento da atividade de células NK
Ativação de macrófagos
Estímulo para geração de célula T
Efeito na função múltipla de linfócitos
Citotoxicidade
Produção de citocinas
Efeito na proliferação de linfócitos
Inibição de proliferação de linfócitos ativados <i>in vitro</i>
Aumento em número de célula NK <i>in vivo</i>
Efeito em células endoteliais
Antiangiogênese
Aumento de molécula de adesão celular

Adaptado de Herberman (1997)

Por outro lado, o IFN- α é contra-indicado para pacientes com epilepsia grave ou doença cardíaca. Devido à atividade antiproliferativa, o IFN- α não é indicado para uso em gestantes. Embora o IFN- α seja usado para o tratamento de algumas infecções virais e de câncer, em pacientes com transplante de órgão, o uso do IFN- α deve ser bem cauteloso devido ao seu efeito estimulador do sistema imune. De fato, o uso do IFN- α em pacientes transplantados está associado com a rejeição dos órgãos (KOVARIK *et al.*, 1988, PAVORD *et al.*, 1992, BROWETT *et al.*, 1994). Há relatos recentes que têm mostrado que a autoimunidade apareceu após o uso de IFN- α ou foi exacerbada pelo IFN- α (RONNBLOM *et al.*, 1991, FLORES *et al.*, 1994, GUERCI *et al.*, 1994, , FUKUYAMA *et al.*, 2000). Portanto, o IFN- α deve ser usado em pacientes com doenças autoimunes com extrema precaução ou, se possível, deve ser evitado.

1.5. IFN- α e doenças autoimunes

A manifestação clínica de determinadas doenças autoimunes em muitos casos leva o aumento de produção de IFN- α , assim como o uso terapêutico desta citocina nos casos de câncer e hepatite C podem causar com frequência manifestações clínicas de autoimunidade aos pacientes (HEREMANS & BILLIAU, 1989, ABDI *et al.*, 1986 RONNBLOM *et al.*, 1991, GUERCI *et al.*, 1994, MORRIS *et al.*, 1996, FUKUYAMA *et al.*, 2000).

O lupus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica inflamatória multissistêmica que pode atingir praticamente qualquer órgão, porém afeta de forma característica os rins, as articulações, as membranas serosas e a pele. É um modelo típico de doença autoimune sistêmica, onde se observa a produção policlonal de imunoglobulinas e a formação de auto-anticorpos contra uma variedade de auto-antígenos, incluindo proteínas plasmáticas (componentes do complemento e fatores da coagulação), antígenos de superfície celular de linfócitos, neutrófilos, plaquetas e hemácias, componentes nucleares e citoplasmáticos intracelulares

(microfilamentos, microtúbulos, lisossomos, ribossomos, DNA, RNA, histonas).

Alguns trabalhos mostraram que o IFN- α/β aumenta a produção de células T, fazendo com que essas células estimulem o aparecimento de lupus idiopático em células normais (BANKHURST, 1987, SCHATTNER *et al.*, 1986). A indução do LES como consequência de uso terapêutico de IFN- α recombinante e natural tem sido exaustivamente relatada (FLORES, *et al.*, 1994, EGOVA & BALABANOVA, 1994, al-JANADI, *et al.*, 1993, HORY, *et al.*, 1992, NICOLETTI, *et al.*, 1992, FUKUYAMA *et al.*, 2000)

Estudos de cruzamento entre camundongos NZB e NZW mostraram que o híbrido F1 (NZBWF1) desenvolve a doença autoimune, apresentando anticorpos anti-DNA característicos do LES humano. Alguns trabalhos mostraram que camundongos NZBWF1 tratados com doses adequadas de IFN- α/β semi-purificado desenvolveram lupus mais precocemente do que quando não tratados (HEREMANS *et al.*, 1978, SERGIESCU *et al.*, 1979). Além disso, os camundongos que têm os sintomas dessa doença mostraram um aumento da habilidade de produzir IFN- α ao estímulo, provavelmente por causa da função alterada das células T e da imunidade mediada por células (HEREMANS *et al.*, 1984). Portanto, o IFN circulante pode ser fator desencadeador de alteração característica de doença autoimune ou a sua presença pode ser causada por disfunção imunológica, participando na aceleração da doença. Os dados obtidos através dos experimentos com camundongos NZBWF1 sugerem que algumas doenças autoimunes podem resultar da ação prolongada de IFN exógeno devido ao uso do IFN em terapia preventiva contra a infecção viral (GRESSER *et al.*, 1978).

Nos últimos anos, evidências obtidas em experimentos têm sugerido um mecanismo de autoimunidade que tem participação importante das citocinas (FELDMAN *et al.*, 1995). No primeiro passo desse mecanismo, alguns fatores circunstanciais, em indivíduos geneticamente predispostos induzem à produção das citocinas provavelmente como consequência da ativação da célula T, que por sua vez participam da indução e da manutenção de doenças autoimunes. Entre essas citocinas temos IL-1, IL-2, IL-6, IFN- α , IFN- γ , TNF- α e outras (Figura 5). As citocinas induzem HLA,

regulando positivamente a capacidade de apresentar antígeno e participa continuamente da interação entre linfócitos T reativos ao auto-antígeno e célula apresentadora de antígeno dos tecidos.

Figura 5. Modelo de desenvolvimento da auto-imunidade (Adaptado de FELDMAN, 1995). As citocinas participam positivamente da iniciação, perpetuação e do desenvolvimento da doença autoimune.

Estudos recentes (ABBAS *et al.*, 1996, ROMAGNANI, 1997) revelaram a existência de dois grupos de células Th (T *helper*) designados Th1 e Th2. O balanço Th1/Th2 é um fator proeminente na determinação da susceptibilidade às doenças autoimunes bem como da progressão e prognóstico dessas doenças (LIBLAU *et al.*, 1995, NICHOLSON & KUCHROO, 1996, LAFAILLE, 1998). Com o recente entendimento do papel da rede de citocinas na regulação das células Th, sabe-se que o IFN- α é um fator importante na diferenciação de células Th1, fazendo com que essas células estimulem a produção de IL-2, IFN- γ e TNF, que por sua vez ativam o sistema imune (BELARDELLI, 1995, TOMPKINS, 1999) (Figura 6). Embora o envolvimento do IFN- α no mecanismo de desenvolvimento das doenças autoimunes seja desconhecido, as observações em experimentos com animais e casos de aparecimento de diversas doenças autoimunes após o uso de IFN- α têm sugerido que o IFN- α contribui para patogênese dessas doenças.

Estes resultados mostraram que a utilização de antagonistas contra o IFN- α , causando o seu bloqueio específico e seguro, pode ser útil na investigação da patogênese de doenças autoimunes e também no estudo de novas alternativas terapêuticas para essas doenças. Por exemplo, a ação do

IFN- α poderia ser inibida pelo uso do anticorpo anti-IFN- α (CHUNTHARAPAI *et al.*, 2001), pelo IFNAR solúvel e anticorpo anti-IFNAR (BENIZRI *et al.*, 1998).

Figura 6. Mecanismo da ação do IFN- α na resposta imune da célula Th1 (Adaptado de TOMPKINS, 1999). A interação entre APC-Th0 estimula APC para produção do IFN- α (1), o qual se liga ao IFNAR na célula Th0. O IFN- α também pode ser liberado em microambiente após a injeção via oral (1a). A ligação de IFN- α ao seu receptor induz a ativação de STAT 2 e STAT 4 (2), a qual funciona independentemente ou em conjunto (3), para aumentar expressão do gene do receptor da IL-12 β 2 e formação do receptor IL-12 β 1 β 2 de alta afinidade (4). Essa formação de receptor IL-12 β 1 β 2 prepara a célula T para responder a IL12 derivada da APC (5). A interação entre IL12 e receptor IL-12 β 1 β 2 ativa STAT 4, um fator de transcrição para IFN- γ que é uma citocina necessária para sustentar resposta imune de célula Th1 ao antígeno. A ativação do STAT 2 e STAT 4 (3a) pode aumentar em conjunto com STAT 4 ativada por IL-12 (6) para ativação de transcrição do IFN- γ (7). APC, célula apresentadora do antígeno; Ag, antígeno; IL12R, receptor da IL12; MHC II, classe II de histocompatibilidade maior; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição; TCR, receptor da célula T; Th 1, célula T helper 1.

1.6. IFN- α e doença do hospedeiro versus enxerto (GVHD)

Tem sido relatado que o IFN- α pode exercer uma importante ação na rejeição ao transplante de medula óssea alogênica, causando a doença do hospedeiro versus enxerto (GVHD) (REYES & KLIMPEL, 1987, KOVARIK *et al.*, 1988, PAVORD, *et al.*, 1992, BROWETT *et al.*, 1994).

A GVHD é induzida por linfócitos T imunocompetentes do doador que são reativos contra aloantígenos apresentados por tecidos do receptor no transplante de medula óssea alogênica (BARRETT, 1989). A GVHD é o principal obstáculo ao transplante de medula óssea, freqüentemente sendo a principal causa de mortalidade dentro das primeiras semanas ou primeiros meses após o transplante (NAGLER *et al.*, 1995). Muitas das manifestações clínicas da GVHD podem ser causadas pela produção desequilibrada de citocinas por células, como por exemplo, células T, monócitos, células NK e células endoteliais. Dentre essas citocinas incluem-se: IL-2, receptor solúvel da IL-2, TNF- α , TNF- β , IFN- γ , IL-1, IL-6 (ANTIN & FERRARA 1992, RABINOWITZ *et al.*, 1993, JADUS & WEPSIC 1992). Além dessas citocinas, existem várias evidências da participação do IFN- α . Observou-se que o aumento dos IFNs - α , - β e - γ está associado com o início da GVHD aguda e crônica em animais (CLEVELAND *et al.*, 1988, REYES *et al.*, 1987, CLEVELAND *et al.*, 1987).

Estudos realizados para esclarecer o papel do IFN- α na GVHD mostraram que células de medula óssea de camundongo, pela estimulação do aloantígeno, produziram altas concentrações do IFN- α/β e geraram células T citotóxicas (Tc) efectoras, as quais são os principais agentes no desenvolvimento dessa doença (KLIMPEL *et al.*, 1982, KLIMPEL & KLIMPEL, 1983). Além disso, a terapia com IFN- α para CML (leucemia mielóide crônica) reocorrida depois de transplante de medula óssea alogênica mostrou desenvolvimento da GVHD grave (PAVORD *et al.*, 1992, KLINGEMANN *et al.*, 1991, BROWETT, *et al.*, 1994). Estes resultados mostraram o mesmo perfil de resultados experimentados em modelos animais, sugerindo o envolvimento de IFN- α na patogênese da GVHD.

Experimentos com animais e algumas tentativas clínicas demonstraram resultados promissores na diminuição da rejeição: Em camundongos, anticorpos anti-IFN- α/β de camundongo diminuíram a resistência à medula óssea alogênica (AFIFI *et al.*, 1985). Dessa forma, pode-se inferir que inibidores da ação do IFN- α seriam úteis para o esclarecimento do papel do IFN- α na interação da rede de citocinas e na

patogênese, bem como, para aplicação em pacientes com doenças autoimunes e em transplantados de medula óssea.

1.7. Agentes antagonistas de IFN- α

Para a prevenção da GVHD e para o tratamento de doenças autoimunes, há necessidade de se suprimir a resposta imune. Tradicionalmente, isso se baseia em tratamentos com agentes imunossupressores, como por exemplo a ciclosporina A, o metotrexato e os corticosteróides (WHITE, 1991). Entretanto, esse tipo de tratamento não é específico, pois, no caso de transplante de medula óssea, ele causa imunossupressão adicional para o paciente e, conseqüentemente, maior risco de infecções.

Para a terapia do lupus eritematoso sistêmico, usam-se atualmente fármacos antiinflamatórios não-esteroidais, corticosteróides, fármacos antimaláricos e imunossupressores (ciclofosfamida) (PISETSKY *et al.*, 1997). Os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais podem produzir disfunções renais, agravando a nefrite em pacientes com lupus. Eles também são responsáveis pela disfunção hepática de pacientes com essa doença. Os fármacos antimaláricos podem causar toxicidade ocular, ou seja, podem depositar-se na retina, o que prejudica a visão. Para todos os pacientes, a importante meta da terapia é maximizar os benefícios clínicos enquanto se minimiza a toxicidade dos agentes terapêuticos. Por essa razão, têm sido estudados fármacos mais específicos, sendo que a inibição da atividade das citocinas, que participam em todas as fases da resposta imune, tornou-se uma alternativa terapêutica. Considerando a desregulação do IFN- α nas doenças autoimunes e GVHD, iniciaram-se investigações visando a produção de inibidores da ação do IFN- α para a sua possível utilização na terapia destas.

A produção de inibidores da ação do IFN- α tem sido estudada de três maneiras.: (1) anticorpos anti-IFN- α , (2) anticorpos anti-IFNAR 1 e (3) proteínas recombinantes do domínio extracelular da IFNAR 1, que têm a região de ligação com o IFN- α , mas são incapazes de sinalizar para o

estabelecimento da ação do IFN- α . Os anticorpos anti-IFN- α inibem apenas algumas subclasses dentre as 12 subclasses do IFN- α , sendo necessária a produção de anticorpos contra cada subclasse. Os anticorpos anti-IFNAR 1, porém, neutralizaram a atividade biológica de várias subclasses do IFN- α e também a atividade do IFN- β e IFN- ω (BENOIT *et al.*, 1993, LU *et al.*, 1998). Entretanto, o uso de xenoanticorpo em pacientes é muito limitado, já que esses anticorpos são tratados como estranhos pelo sistema imune dos pacientes.

Nguyen e cols. (1996) produziram a proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 1 em *E. coli* e avaliaram que essa proteína inibiu a atividade antiviral de 10 pM de IFN- α B e a atividade antiproliferativa de 2,5 pM de IFN- α B. Porém, para esta inibição, foi necessária uma concentração da proteína 71 a 78 vezes maior do que a concentração de IFN- α B. Essa proteína também não inibiu a atividade do IFN- α B quando o mesmo apresenta concentrações maiores que 10 pM.

Hirata e cols. (1996) produziram os três fragmentos polipeptídicos (M1: aminoácidos 1-102, M2: aminoácidos 93-260, M3: aminoácidos 261-410) do domínio extracelular da IFNAR 1. O fragmento polipeptídico M3 inibiu a atividade antiproliferativa de 2,5 pM de IFN- α B e competiu com os receptores da superfície de células Daudi na ligação com o IFN- α B. Porém, M3 não inibiu a atividade do IFN- α em maiores concentrações.

Yoon e cols. (2000) avaliaram a inibição da atividade antiproliferativa do IFN- α B utilizando anticorpos policlonais contra M2 e M3. Observaram que para altas concentrações de IFN- α B (>6,25 nM) os anticorpos não bloquearam a atividade do IFN- α B.

A necessidade de altas concentrações de proteínas recombinantes para bloquear a ação do IFN- α B e a sua incapacidade de bloqueá-la na presença de altas concentrações de IFN- α B nos experimentos acima citados vêm sugerindo que o antagonista da IFNAR 1 não é um inibidor potente da ação do IFN- α , pois o IFN- α se liga a IFNAR 1 com baixa afinidade. Seria interessante, então, a produção do antagonista da IFNAR 2c, já que o IFN- α se liga à IFNAR 2c com maior afinidade. Ou seja, a proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c pode ser melhor antagonista do IFNAR

natural na superfície das células do que a proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 1.

Continuando a nossa investigação da produção de inibidores da ação do IFN- α , no presente estudo nos propomos a investigar a produção da proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c e avaliar sua inibição da ação do IFN- α . Para atingir esses objetivos, o fragmento de DNA do domínio extracelular da IFNAR 2c foi produzido pela PCR utilizando cDNA da IFNAR 2c. Esse fragmento de DNA do domínio extracelular da IFNAR 2c foi clonado no vetor de expressão pRSET A e pGEX 4T-2. A expressão da proteína foi induzida em *E. coli*. Para avaliar a inibição da ação do IFN- α pela proteína recombinante foram utilizados testes antiviral e antiproliferativo *in vitro*. Foi avaliada também a atividade bloqueadora da proteína recombinante ao nível da expressão do mRNA dos genes STAT 1 e 2',5'-OAS, pois STAT 1 é um componente de ISGF 3 para sinalização da atividade do IFN- α e 2', 5'-OAS é proteína efetora induzida por IFN- α . Vários métodos têm sido desenvolvidos para a detecção e quantificação da expressão da mRNA em diferentes amostras. Dentre eles, podemos mencionar a técnica de Northern blot, a hibridização *in situ* e a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), apresentando cada uma delas diversas vantagens. Atualmente, o método de RT-PCR é o mais utilizado para a detecção e quantificação de expressão gênica, devido a sua alta sensibilidade e de menor tempo de ensaio. Com base nas informações apresentadas, o presente trabalho optou por RT-PCR para avaliar a expressão gênica de STAT 1 e 2', 5'-OAS. A avaliação da expressão gênica do STAT 1 pode nos esclarecer a atividade bloqueadora da proteína recombinante ao nível do mecanismo da sinalização e a avaliação da expressão gênica da 2', 5'-OAS, ao nível do mecanismo da proteína efetora.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são produção, caracterização e avaliação da atividade biológica da proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c do IFN- α .

Os objetivos específicos são:

- 1) Subclonagem do fragmento de DNA do domínio extracelular da IFNAR 2c no vetor de expressão pRSET A e pGEX 4T-2 e produção da proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c (IFNAR2cEC).
- 2) Avaliação da inibição da ação do IFN- α pelas proteínas recombinantes IFNAR2cEC através dos testes antiviral e antiproliferativo *in vitro*.
- 3) Avaliação da atividade bloqueadora da IFNAR2cEC ao nível da expressão do mRNA dos genes STAT 1 e 2', 5'-OAS, utilizando células da linhagem Daudi e Hep 2/c.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 7 mostra um esquema das etapas realizadas para atingir os objetivos propostos.

Figura 7: Esquema das etapas realizadas para atingir o objetivo proposto

3.1. Materiais

3.1.1. Linhagens bacterianas

Para os experimentos da clonagem e da expressão foram utilizadas as seguintes cepas de *E. coli*:

As cepas de *E. coli* DH5 α e BL21(DE3) foram utilizadas para a subclonagem e a expressão da proteína recombinante.

A cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foi utilizada para expressão da proteína recombinante.

As cepas de DH5 α e BL21(DE3)pLysS foram fornecidas pela Dra. Nga Y Nguyen (Food and Drug Administration, Bethesda, EUA). A cepa de BL21(DE3) foi fornecida pela Dra. Ana Claudia Rasera da Silva (Instituto de Química, USP, São Paulo).

3.1.2. Células de linhagens Daudi, Hep2/c e L929

As células de linhagem Daudi são originadas de células B linfoblastóides humanas, estabelecida a partir de um linfoma de Burkitt de um paciente masculino de 16 anos. Estas células são muito sensíveis a IFN- α , interrompendo o ciclo celular em fase G1 em concentrações muito baixas desta citocina. As células de linhagem Daudi foram expandidas e mantidas em meio de RPMI 1640 contendo soro bovino fetal (SBF) a 10 %. Essa linhagem de células foi cedida pela Dra Kath C. Zoon (FDA, Bethesda, EUA) e usada para os ensaios antiproliferativos.

A linhagem Hep 2/c é originada de um carcinoma epitelial, sendo bastante utilizada para bioensaios de IFN- α , - β , e - γ através da inibição dos efeitos citopáticos do vírus encefalomiocardite (EMC). As células de linhagem Hep 2/c foram expandidas e mantidas em meio de RPMI 1640 contendo SBF a 5%. As células Hep 2/c foram cedidas pela Dra. Consuelo L. F. Dias (Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Brasil) e utilizadas para os ensaios antivirais.

A linhagem L929 foi iniciada a partir de um fibroblasto do tecido conectivo de camundongo e é bastante utilizada para bioensaios de IFN- α murino, através da inibição dos efeitos citopáticos do vírus EMC. Essas células foram utilizadas para expansão do vírus EMC. As células de linhagem L929 foram obtidas do Banco de Células de Rio de Janeiro (RJ, Brasil), e expandidas e mantidas em meio de RPMI 1640 contendo SBF a 10 %.

As células das linhagens L929 e Hep 2/c são células aderentes, e por isso foi necessária a tripsinização para seu descolamento.

3.1.3. Vírus encefalomiocardite

As suspensões originais do vírus EMC (gênero *Cardiovirus*, família *Picornaviridae*) foram utilizadas para os ensaios antivirais e foram cedidas pelo Dr. Romain Golgher (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil).

3.1.4. IFN alfa recombinante humano

Foram utilizados os rIFN- α 2a e rIFN- α 2b (Roferon) humanos. Uma ampola de rIFN- α 2a humano (Número de catálogo: Gxa01-901-535) foi obtida do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID)(National Institutes of Health, Bethesda MD, EUA). O rIFN- α 2b (Roferon) foi cedido pelo Dr. David Gangemi (Universidade de Clemson, SC, EUA).

3.2. Métodos

3.2.1. Transformação de *E. coli* DH5 α com plasmídeo recombinante pZipBetaL e expansão do pZipBetaL em *E. coli* DH5 α

O plasmídeo recombinante pZipBetaL (Domanski *et al.*, 1995) foi cedido gentilmente pelo Dr. Oscar R Colamonici. (Universidade de Illinois, Chicago, USA). O pZipBetaL é derivado do vetor pZipNeoSVX em que foi inserido o cDNA da IFNAR 2c (1.548 bp) utilizando o sítio de restrição para enzima *Bam*HI. O pZipBetaL foi utilizado no nosso experimento como molde (fita mãe) na PCR para produção do fragmento de DNA que codifica para a região do domínio extracelular da IFNAR 2c. Estes plasmídeos foram expandidos em *E. coli* DH5 α após a sua transformação.

3.2.1.1. Transformação da *Escherichia coli* DH5 α com plasmídeo pZipBetaL

Utilizando-se 100 μ L de células *E. coli* DH5 α competentes preparadas pelo método de CaCl_2 , adicionou-se 2 μ L do plasmídeo pZipBetaL e incubando em gelo 30 minutos. As células foram submetidas ao choque térmico por 2 minutos a 42 °C, seguido de 2 minutos no gelo, após o qual foi adicionado 1 mL de meio SOC (Tryptona a 2 %, extrato de levedura a 0,5 %, NaCl a 0,05 %, KCl 2,5 mM, Glicose 20 mM, MgCl_2 10 mM), incubando por 5 minutos a 37 °C e então sob agitação 200 rpm por 1 hora a 37 °C. As células transformadas foram plaqueadas em meio de LB-ágar contendo ampicilina (100 μ g/mL), em vários volumes (150 μ L, 300 μ L, 500 μ L). As placas foram incubadas a 37 °C em estufa por 16 horas. As colônias selecionadas foram utilizadas para expansão e obtenção de plasmídeos pZipBetaL.

3.2.1.2. Obtenção e purificação do plasmídeo pZipBetaL e avaliação da presença do fragmento de DNA que codifica para a IFNAR 2c

A extração de DNA plasmidial em pequena escala, e sua restrição enzimática foram realizadas segundo descrito em Sambrook e cols. (1989). Expandiu-se cada colônia isolada em tubos de 15 mL contendo 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 μ g/mL), incubando-a a 37 °C por 16 horas, sob agitação de 250 rpm. Centrifugou-se por 15 minutos a 7.000 x *g*, à temperatura ambiente. Removeu-se o sobrenadante, deixando uma pequena porção para ressuspender as células sedimentadas de forma cuidadosa, e transferiu-se para um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL. Centrifugou-se por 3 minutos, a 8.000 x *g*, à temperatura ambiente. Removeu-se a maior quantidade possível de sobrenadante. A seguir, o sedimento foi ressuspensionado em 100 μ L de solução I gelada (Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, RNase 100 μ g/mL). Adicionou-se 200 μ L de solução II (SDS a 1%, NaOH 0,2 M) recém preparada, homogeneizou-se a mistura por inversão várias vezes, incubou-se em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 150 μ L de solução III (KAc 3M, HAc a 11,5%) previamente resfriada, agitou-se e nova incubação em banho de gelo foi realizada por 20–30 minutos. Centrifugou-se a 12.000 x *g* por 10 minutos, a 4 °C para separação do sobrenadante. Foi recolhido o sobrenadante contendo o DNA, que foi precipitado com a adição de 1 mL de etanol

absoluto gelado, seguida de centrifugação (12.000 x *g*, 10 minutos, 4 °C). O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol a 70 % e mantido à temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. Finalmente o DNA plasmidial foi reidratado com 50 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e estocado a -20 °C. Para confirmar a presença do fragmento de DNA que codifica para a IFNAR 2c, o pZipBetaL foi submetido à clivagem com enzima de restrição *Bam*HI. A identificação do fragmento foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % em TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,0) a 100 V, por 40 minutos, após coloração com brometo de etídeo, utilizando-se um marcador de pares de base DNA 1Kb PLUS (Gibco BRL, Rockville, MD, USA).

3.2.2. Produção do fragmento de DNA que codifica para o domínio extracelular da IFNAR 2c (IFNAR2cEC) pela PCR

3.2.2.1. Escolha dos iniciadores com inclusão dos sítios de restrição para enzima *Bam*HI e *Eco*R I

A sequência dos iniciadores foi selecionada com base na descrição de Domanski e cols (Figura 8, 1995). A figura 8 demonstra as sequências de nucleotídeos da IFNAR 2c: Iniciador 5', constituído de 21 nucleotídeos (1-21) da sequência do DNA que codifica para a região do domínio extracelular da IFNAR2c (Veja as sequências sublinhadas na figura 8). Acrescentou-se nesse iniciador 5' a sequência de reconhecimento para a enzima de restrição *Bam*HI, para permitir a clonagem, e mais três nucleotídeos adequadamente escolhidos na extremidade de 5' permitindo maior eficiência de clivagem pelas enzimas de restrição. O iniciador 3', constituído de 23 nucleotídeos (707-729) da sequência complementar do DNA que codifica para a região do domínio extracelular da IFNAR2c (Veja as sequências sublinhadas na figura 8). Nesse iniciador acrescentaram-se a sequência do reconhecimento para a enzima de restrição *Eco*RI e mais três nucleotídeos adequadamente escolhidos na extremidade de 5' para maior eficiência de clivagem com enzimas de restrição. Os sítios de restrição para *Bam*HI e *Eco*RI foram escolhidos por 2 motivos: 1) Ambas se encontram em

dois vetores de expressão, pRSET A e pGEX 4T-2 com a mesma ordem (*Bam*HI → *Eco*RI), assim permitindo a inserção do fragmento de DNA do IFNAR2cEC em dois vetores. 2) O estudo do mapa de enzimas de restrição do DNA de IFNAR2cEC pelo programa CLONE[®] mostrou a ausência desses sítios de enzimas de restrição, evitando-se assim a clivagem indesejável do fragmento por *Bam*HI e *Eco*RI. A sequência dos iniciadores foi reavaliada com o cDNA da IFNAR 2c pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>). As seqüências dos iniciadores estão mostradas a seguir, as temperaturas de desnaturação (T_m) foram determinadas pelo programa OLIGO.:

Iniciador 5' (30 bp, 46 % de GC, $T_m = 72,3$ °C):

5' ATA GGA↓TCC ATG CTT TTG AGC CAG AAT GCC 3'
*Bam*HI

Iniciador 3' (32 bp, 40 % de GC, $T_m = 67,5$ °C):

5' TCT GAA↓TTC TTT GGC AGA TTC TGC TGA TTC TG 3'
*Eco*RI

3.2.2.2. Produção do fragmento de DNA que codifica para o domínio extracelular da IFNAR 2c pela PCR (IFNAR2cEC)

Para amplificação do IFNAR2cEC pela PCR, utilizou-se PLATINUM *Pfx* DNA polimerase[®] (Gibco BRL, Rockville, MD, EUA), a qual reconhece erros na cópia durante a polimerização (*mismatch*) e devido a sua atividade 3'→5' exonuclease que é capaz de corrigi-las, tendo assim alta fidelidade na polimerização de nucleotídeos. As condições ideais de amplificação pela PCR foram estudadas modificando a temperatura de hibridação (64 °C, 65 °C e 66 °C), número de ciclos (25 e 30) e concentração dos iniciadores (0,24 μM e 0,3 μM). Após os resultados iniciais, foram estabelecidas as seguintes condições como ideais: a 1 μL de plasmídeo pZipBetaL foram adicionados 5 μL de tampão de *Pfx* DNA polimerase 10X, MgSO₄ 1 mM, 200 μM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 μM de cada iniciador (5' e 3'), 1,25 U de PLATINUM *Pfx* DNA polimerase e água estéril para volume final de 50 μL. Os tubos com os reagentes foram homogeneizados e colocados

no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) programado da seguinte forma.:

- (1) Desnaturação inicial (*hot start*): 94 °C por 2 minutos.
- (2) Amplificação: 30 ciclos de 94 °C/15 segundos, 65 °C/30 segundos e 68 °C/1 minuto. Ao final dos ciclos a reação é interrompida por esfriamento a 4 °C.

Os produtos da PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 %, em tampão TBE (Tris-HCl a 0,45 mM, ácido bórico a 0,45 mM e EDTA a 2,5 mM, pH 8,0), utilizando 100 V por 30 minutos, após coloração com brometo de etídeo, utilizando-se um marcador de pares de base de DNA de 1Kb PLUS. O produto da PCR que corresponde ao domínio extracelular do IFNAR 2c pela PCR, corresponde a um fragmento de 747 bp que foi estimado da seguinte forma;

$$\begin{aligned} 747 \text{ bp} &= 729 \text{ (DNA do IFNAR2cEC)} \\ &+ 9 \text{ (nucleotídeos adicionais no iniciador 5')} \\ &+ 9 \text{ (nucleotídeos adicionais no iniciador 3')} \end{aligned}$$

¹
atgc tttagagcca gaatgccttc atcttcagat cacttaattt ggttctcatg gtgtatatca gcctcgtgtt tggattttca
 tatgattcgc ctgattacac agatgaatct tgcactttca agatatcatt gcgaaatttc cgggccatct tatcatggga
 attaaaaaac cactccattg taccaactca ctatacattg ctgtatacaa tcatgagtaa accagaagat ttgaagggtg
 ttaagaactg tgcaaatacc acaagatcat ttgtgacct cacagatgag tggagaagca cacacgaggc ctatgtcacc
 gtccctagaag gattcagcgg gaacacaacg ttgttcagtt gtcacacaa tttctggctg gccatagaca tgtctttga
 accaccagag tttagattg ttggtttac caaccacatt aatgtggtgg tgaaattcc atctattgtt gaggaagaat
 tacagttga tttatctctc gtcattgaag aacagtcaga gggaattgtt aagaagcata aaccggaaat aaaaggaaac
 atgagtggaa atttcaccta tatcattgac aagttaattc caaacacgaa ctactgtgta tctgtttatt tagagcacag
 tgatgagcaa gcagtaataa agtctccctt aaaatgcacc ctcttccac ctggccagga atcagaatca gcagaatctg
ccaaaatagg ⁷³⁰ **aggaataatt actgtgtttt ttagtagcatt ggtcttgaca agcaccatag tgacactgaa** ⁷⁹³
 atggattggt tatatatgct taagaaatag cctcccaaaa gtcttgaatt ttcataactt ttagcctgg ccatttcta
 acctgccacc gttggaagcc atggatatgg tggaggatcat ttacatcaac agaaagaaga aagtgtggga ttataattat
 gatgatgaaa gtgatagcga tactgaggca gcgcccagga caagtggcgg tggctatacc atgcatggac
 tgactgtcag gcctctgggt caggcctctg ccacctctac agaattcccag ttgatagacc cggagtccga ggaggagcct
 gacctgctg aggttgatgt ggagctcccc acgatgcaa aggacagccc tcagcagttg gaactctga gtgggccctg
 tgagaggaga aagagtccac tccaggaccc tttcccgaa gaggactaca gctccacgga ggggtctggg
 ggcagaatta cctcaatgt ggacttaaac tctgtgtttt tgagagttct tgatgacgag gacagtacg acttagaagc
 ccctctgatg ctatcgtctc atctggaaga gatggttgac ccagaggatc ctgataatgt gcaatcaaac catttgctgg
 ccagcgggga agggacacag ccaaccttc ccagcccctc ttcagagggc ¹⁵⁴⁸ ctgtgttccg aagatgctcc
 atctgatcaaagtgcactt ctgagtcaga tgtgacctt ggggatggtt atataatgag

Figura 8. Seqüência codificadora da subunidade 2c do receptor do IFN- α (IFNAR 2c) (GeneBank: número de acesso-U29584, Domanski *et al.*, 1995). O domínio extracelular (1-729) de 243 aminoácidos é constituído da seqüência em itálico, o domínio transmembrana (730-792) de 21 aminoácidos em negrito e o domínio citoplasmático (793-1548) de 251 aminoácidos em normal. As seqüências em azul e itálico são os iniciadores 5'e 3'.

Figura 9. Esquema da subclonagem do domínio extracelular da IFNAR 2c (IFNAR2cEC), transformação em *E. coli* e expressão proteica.

3.2.3. Subclonagem do fragmento de DNA que codifica para o domínio extracelular da IFNAR 2c nos vetores de expressão pRSET A e pGEX 4T-2

Foram empregados dois plasmídeos pRSET A (Invitrogen, California, USA) e pGEX 4T-2 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden), a fim de verificar qual seria melhor vetor para expressão da proteína recombinante biologicamente ativa (Figura 10).

Figura 10. Esquema dos vetores da expressão pGEX 4T-2 e pRSET A. O vetor pGEX 4T-2 é constituído de promotor *tac* induzível por IPTG, operador *lac*, o gene que confere resistência à ampicilina, a região de múltipla clonagem, e sítio de reconhecimento para a trombina para clivagem da proteína recombinante do produto de fusão. O vetor pRSET A é um sistema de expressão de proteína, o qual inclui a região de múltipla clonagem para as várias enzimas de restrição, tendo o promotor T7, o gene que confere resistência à ampicilina e sítio de reconhecimento para enterocinase para remoção de produto de fusão indesejável (*fusion tag*).

3.2.3.1. Purificação do fragmento de DNA que codifica para o IFNAR2cEC (inserto)

O inserto (100 µL) obtido pela PCR foi purificado com o kit CONCERT Rapid PCR Purification System® (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) conforme a recomendação do fabricante e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). O inserto purificado (40 µL) foi clivado com 25 U *Bam*HI e 25 U *Eco*RI por 2 horas a 37 °C e novamente purificado com o kit CONCERT Rapid PCR Purification System® conforme a recomendação do fabricante. O inserto clivado e purificado foi quantificado por espectrofotometria UV-A260/280, utilizando equipamento da Beckman, modelo DU-640 (Columbia, MD, USA).

3.2.3.2. Purificação de plasmídeos pRSET A e pGEX 4T-2

Os plasmídeos pRSET A e pGEX 4T-2 (40 µL) foram clivados com 50 U das enzimas de *Bam*HI e *Eco*RI por 2 horas a 37 °C. O plasmídeo clivado foi separado em gel de agarose a 0,8 % em tampão TBE e os fragmentos separados foram purificados com o kit CONCERT Gel Extraction Systems® (Gibco BRL, Rockville, MD, USA) conforme a recomendação do fabricante. Os produtos purificados foram quantificados por espectrofotometria UV-A260/280, utilizando equipamento Beckman, modelo DU-640.

3.2.3.3. Ligação de inserto nos vetores de expressão pRSET A e pGEX 4T-2

Para cada reação de ligação, 6-8 µL de plasmídeos linearizados (80 ng) e 8-10 µL de inserto (10 vezes maior em relação molar) foram incubados respectivamente com os plasmídeos linearizados com 2 U de T4 DNA ligase® na presença de ATP tamponado (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden) por 1 hora à 25 °C ou 16 horas à 16 °C, em volume final de 20 µL. Após a reação de ligação, 10 µL de cada mistura da ligação obtida foi imediatamente utilizada para a transformação de células competentes *E. coli* DH5α (para pGEX 4T-2) ou *E. coli* BL21(DE3)(para pRSET A) pelo método já descrito no item anterior (item 3.2.1.1.).

3.2.3.4. Estudo de colônias para avaliação da eficiência da clonagem

As colônias supostamente transformadas foram triadas para verificar a presença do plasmídeo com inserto, utilizando a extração do plasmídeo do cultivo da colônia com o kit FlexiPrep® (Amercham Pharmacia, Uppsala, Sweden) conforme a recomendação do fabricante e posterior avaliação do plasmídeo por enzima de restrição. Foi feita, também, a pesquisa do fragmento clonado diretamente nas colônias transformadas pela PCR. Foi escolhida para amplificação dos fragmentos na triagem das colônias transformadas a *Tth* DNA polimerase® (Biotools, Madrid, Espanhol). A 1 µL de plasmídeo ou 1 colônia transformada foram adicionados 5 µL de tampão de *Tth* DNA polimerase 10X, 200 µM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada iniciador (5' e 3'), 1,5 U de *Tth* DNA polimerase e água estéril para volume final de 50 µL. Os tubos com os reagentes foram homogeneizados e colocados no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) programado da seguinte forma:

- (1) Desnaturação inicial (*hot start*): 95 °C por 3 min.
- (2) Amplificação: 25 ciclos de 94 °C/1 minuto, 66 °C/1 minuto e 72 °C/1 minuto.
- (3) Extensão final: 72 °C/10 minutos. Ao final dos ciclos a reação é interrompida por esfriamento a 4 °C.

Utilizou-se maior tempo e temperatura mais elevada de desnaturação inicial para permitir ruptura eficiente da membrana das células bacterianas para liberação do DNA plasmidial.

3.2.3.5. Análise de seqüência do plasmídeo recombinante

A seqüência do inserto do plasmídeo recombinante pGEX-IFNAR2cEC foi analisada utilizando-se o kit Big Dye terminator cycle sequencing e o termociclador Peltier Thermal cycler-200, MJ Research, Inc. (Lab. Trade do Brasil). O produto da reação para o seqüenciamento foi purificado conforme a recomendação do fabricante e analisado no ABI Prism

377 Genetic Sequencer. A homologia da sequência de nucleotídeos entre inserto e a sequência original foi verificada usando o programa BLAST.

3.2.4. Expressão da proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c (IFNAR2cEC) em *E. coli*

A expressão da proteína recombinante pela *E. coli* transformada com o plasmídeo recombinante pRSET-IFNAR2cEC foi realizada em duas cepas: a BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS. A *E. coli* BL21(DE3) é a cepa recomendada para a expressão de proteínas no vetor pRSET, por ser deficiente em *ompT* protease da membrana externa que pode degradar proteína durante purificação (Grodberg & Dunn, 1988). Essa cepa contém promotor lacUV5 induzível por IPTG. A cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS contém o plasmídeo pLysS que é constituído do gene de lisozima T7 e o gene de resistência ao cloranfenicol. A presença do plasmídeo pLysS aumenta a tolerância da cepa BL21(DE3) à toxicidade da proteína-alvo estabilizando plasmídeo recombinante-alvo. Realizou-se a expressão da proteína recombinante em *E. coli* DH5 α transformada com pGEX-IFNAR2cEC, o qual apresenta a proteína de fusão com Glutathione-S-transferase. A cepa *E. coli* DH5 α apresenta o genótipo *recA1* que assegura maior estabilidade ao inserto, por prevenir a recombinação entre o DNA do inserto e da célula hospedeira, por isso é bastante recomendada para clonagem. Como as bactérias transformadas com pGEX-IFNAR2cEc apresentaram uma ótima expressão protéica com esta cepa, foi a escolhida.

Partindo de uma colônia transformada com o plasmídeo recombinante, expandiu-se em 5 mL de LB líquido com antibióticos por 16 h a 37 °C sob agitação a 150 rpm. A suspensão celular foi diluída a 1/100, inoculada em meio de cultura novo e incubou-se a 37 °C sob agitação a 250-300 rpm. Ao atingir a fase de crescimento exponencial, com D.O.₆₀₀ $\cong$ 0,5 - 0,6, a expressão protéica foi induzida com a adição IPTG a 0,1 mM por 3-4 h a 37 °C ou 25 °C sob a agitação a 200 ou 250 rpm. Para a avaliação da expressão protéica, o sedimento celular total foi submetido a SDS-PAGE a 12,5 % e corado com Coomassie Blue, utilizando como referência o padrão da proteína de alto peso molecular (Gibco BRL, Rockville, MD, USA).

3.2.5. Isolamento da proteína recombinante

Foram empregados 3 métodos de lise celular para isolamento da proteína recombinante, ou seja, sonicação, *French Press* e o uso do kit BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, Madison, WI, USA).

3.2.5.1. Lise celular por sonicação para isolamento da proteína recombinante

A suspensão de cultura celular com 3 h de indução com IPTG a 37 °C ou 25 °C foi centrifugada a 4.000 x g, 5 minutos. O sedimento foi ressuspendido em tampão de sonicação (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM e DTT 2 mM) e submetido à sonicação, sob refrigeração em banho de gelo. Centrifugou-se a 16.600 x g por 10 minutos e removeu-se o sobrenadante (S1) e ressuspendeu-se o sedimento com tampão de sonicação contendo 1 % de Triton X-100. Repetiu-se o procedimento mencionado, para se obter os sobrenadantes 2 e 3 (S2 e S3). Os sedimentos (P) e sobrenadantes obtidos foram analisados por eletroforese em SDS-PAGE a 12,5 % e corado com Coomassie Blue.

3.2.5.2. Ruptura de células por *French Press* para isolamento da proteína recombinante

A suspensão de cultura celular com 3 horas de indução com IPTG a 0,1 mM a 37 °C ou 25 °C foi centrifugada a 5.000 rpm utilizando a centrífuga refrigerada, modelo de RC 5B Plus da marca Sorvall (Wilmington, DE, EUA) por 15 min. a 4 °C. O sedimento celular foi ressuspendido em tampão (PBS 0,15 M, pH 7,3, PMSF 1 mM, DTT 5 mM). A ruptura das células foi concluída com sucessivas (3x) passagens da suspensão por uma *French Press* (*French's Pressure cell*, Aminco) com pressão de 1.000 psi até que sua viscosidade fosse sensivelmente diminuída. Em seguida, centrifugou-se a suspensão 24.500 x g por 30 min. a 4 °C utilizando a ultracentrífuga Himac 70P-72 (Hitachi, Tokyo, Japão). Os sedimentos e sobrenadantes obtidos foram analisados por eletroforese em SDS-PAGE a 12,5 % e corado com Coomassie Blue.

3.2.5.3. Isolamento da proteína recombinante pelo kit BugBuster Protein Extraction System® (Novagen, Medison, WI, USA)

O kit BugBuster é formulado a base de detergente não-iônico para lise celular de *E. coli*, resultando na liberação da proteína solúvel sem desnaturação da mesma (Burgess, 1996).

A suspensão de cultura celular com 3 horas de indução com IPTG a 25 °C foi centrifugada a 5.000 rpm utilizando a centrífuga do modelo de RC 5B Plus da marca Sorvall por 15 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi ressuspenso no reagente BugBuster conforme a recomendação do fabricante. Em seguida, centrifugou-se a suspensão 24.500 x *g* por 30 minutos a 4 °C utilizando a ultracentrífuga Himac 70P-72. Os sedimentos e sobrenadantes obtidos foram analisados por eletroforese em SDS-PAGE a 12,5 % e corado com Coomassie Blue.

3.2.6. Coexpressão com chaperonina GroEL/ES

A função da chaperonina na estabilização da proteína recombinante tem sido bem estudada com o sistema GroEL/ES em *E. Coli*. Observa-se que a chaperonina é muito eficaz para solubilização das proteínas expressas quando essas são coexpressas, porque a chaperonina intermedia o *folding* pós-traducional e armazenamento da proteína recombinante (Schmidt *et al.*, 1994, Weissman *et al.*, 1996, Clarke, 1996) .

Avaliou-se a eficiência da chaperonina GroEL/ES na solubilização da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC através da coexpressão das proteínas chaperonina.

3.2.6.1. Transformação da *Escherichia coli* DH5α com plasmídeo pAYCELES

O plasmídeo pAYCELES foi cedido gentilmente pela Dra. Ana Claudia Rasera da Silva (Instituto de Química, USP, São Paulo). O plasmídeo contém o gene que codifica para chaperonina GroEL/ES e o gene de resistência ao cloranfenicol.

Efetuiu-se a transformação como descrito no item anterior (3.2.1.1.), utilizando-se 2 μ L do plasmídeo pAYCELES e 100 μ L de células *E.coli* DH5 α competentes preparadas pelo método de CaCl₂. As colônias selecionadas pela resistência ao cloranfenicol (25 μ g/mL) foram submetidas à indução de expressão protéica com a adição de IPTG como descrito no item anterior (3.2.4.).

3.2.6.2. Obtenção das células competentes pAYCELES/*E. coli* DH5 α e nova transformação de células competentes pAYCELES/*E. coli* DH5 α com plasmídeo pGEX-IFNAR2cEC

Após a confirmação da expressão da chaperonina GroEL/ES na colônia pAYCELES/ *E. coli* DH5 α , essas células foram tratadas com CaCl₂ para se tornarem competentes.

Efetuiu-se nova transformação como descrito no item anterior (3.2.1.1.), utilizando-se 2 μ L do plasmídeo pGEX-IFNAR2cEC e 100 μ L de células competentes pAYCELES/*E. coli* DH5 α . As colônias transformadas foram selecionadas utilizando cloranfenicol (25 μ g/mL) e ampicilina (100 μ g/mL).

3.2.6.3. Coexpressão das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC e chaperonina GroEL/ES

As colônias selecionadas foram submetidas à expressão protéica por 3 horas com a indução de IPTG a 37 °C como descrito no item anterior (3.2.4.). Verificou-se a coexpressão das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC e chaperonina GroEL/ES. Submeteu-se ao isolamento dessas proteínas coexpressas pela sonicação descrita no item anterior (3.2.5.1.).

3.2.7. Purificação da proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR2c (IFNAR2cEC).

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade, usando-se resina de Glutathione Sepharose®

(Pharmacia, Uppsala, Sweden), de acordo com Smith (1988) (Figura 11). A proteína de fusão GST-IFNAR2cEC foi obtida pela eluição com glutatona reduzida (Pharmacia, Uppsala, Sweden). As amostras de todas as fases da purificação foram avaliadas por SDS-PAGE a 12,5 %.

Figura 11. Esquema da purificação das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC e IFNAR2cEC

3.2.7.1. Solubilização

A suspensão de cultura celular obtida 3 horas após a indução com IPTG a 25 °C foi submetida à centrifugação e o sedimento foi lisado por *French Press* e centrifugado conforme o item 3.2.5.2. Após a centrifugação, o sobrenadante (fração solúvel) foi imediatamente utilizada para a purificação com cromatografia de afinidade.

3.2.7.2. Cromatografia de afinidade

De acordo com a especificação do produto, a capacidade de ligação da resina de Glutathione sepharose é de 8 mg de proteína por mL de resina hidratada.

Para cada 20 mL de fração solúvel, adicionou-se 2 mL de Glutathione sepharose a 50 % e a suspensão foi mantida sob agitação a baixa rotação, por 1 hora à temperatura ambiente. Após o período para a adsorção da proteína, a resina foi centrifugada a 500 x g por 5min. A resina foi lavada com 30 mL de PBS 0,15 M, pH 7,3 gelada e centrifugada a 500 x g por 5min. Repetiu-se o processo de lavagem mais três vezes. As proteínas ligadas à resina foram então submetidas a eluição com glutathione reduzida.

A eluição da proteína de fusão GST-IFNAR2cEC foi realizada com glutathione reduzida a 5 mM em tampão de eluição (Tris-HCl 5 mM, pH 8,0.) Adicionou-se 1 mL de glutathione reduzida a 5 mM em tampão de eluição e misturou-se gentilmente por 2 min. A seguir, centrifugou-se a 500 x g por 5min. e o sobrenadante foi reservado, como eluato (E1) contendo GST-IFNAR2cEC. Repetiu-se este procedimento por mais duas vezes, e os eluatos (E1, E2 e E3) foram agrupados. O eluato foi imediatamente congelado a -70°C para ser utilizado como GST-IFNAR2cEC.

3.2.7.3. Clivagem com trombina para obtenção da proteína recombinante IFNAR2cEC

A protease trombina (Amersham Pharmacia) foi usada para clivar IFNAR2cEC da proteína GST. Entre a proteína GST e a IFNAR2cEC se encontram os amino ácidos Leu/Val/Pro/Arg-Gly/Ser, e a trombina cliva a ligação de amino ácidos Arg-Gly. O peso molecular de trombina é aproximadamente 37 kDa e uma unidade cliva $\geq 90\%$ de 100 μg de proteína de fusão com GST por 16 h a 22°C .

3.2.7.3.1. Clivagem com trombina na resina ligada com a proteína de fusão

Para clivar a proteína recombinante IFNAR2cEC da GST na resina, foi necessário interromper o processo de eluição com glutathione reduzida do item 3.2.7.2. Após a ligação da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC na resina e a lavagem, adicionaram-se 50 U de trombina (50 U de trombina em 950 mL de PBS 0,15 M, pH 7,3) para cada 1 mL de glutathione a 50 %. A suspensão foi incubada com agitação a temperatura ambiente por 2~16 horas, centrifugada a 500 x g e conservada a -20°C como IFNAR2cEC

3.2.7.3.2. Clivagem da proteína de fusão eluída com trombina

Para cada 100 µg de proteína, adicionou-se 10 U de trombina (1 U/1 µL de PBS) e incubou-se sob agitação baixa a temperatura ambiente por 2~16 horas. A mistura foi incubada com glutatona reduzida a 50 % sob baixa rotação por 1 hora a temperatura ambiente, centrifugada a 500 x g e conservada a – 20 °C como IFNAR2cEC

3.2.7.4. Western Blot e Imuno Blot utilizando anticorpo policlonal anti-GST produzido em coelho

Com o objetivo de avaliar a fração de GST no procedimento de purificação da proteína GST-IFNAR2EC e no procedimento de clivagem com trombina, foi feito Western blot e Imuno blot das amostras da purificação e da clivagem com trombina utilizando anticorpo policlonal anti-GST produzido em coelho. O anticorpo policlonal anti-GST foi produzido em coelho e foi cedido gentilmente por Dra Rosario D. C. Hirata (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, SP).

3.2.7.4.1. Western Blot

Foram separadas as proteínas a analisar por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (PAGE-SDS) e transferidas para uma membrana de PVDF (0,2 µm) (Bio-Rad, CA, USA) previamente tratada com metanol a 100 % por 5 min e lavada duas vezes com 100 mL de água destilada. Enquanto se desenvolvia a corrida eletroforética, cortou-se a membrana do tamanho do gel a ser transferido e equilibrou a membrana no tampão de transferência (Glicina a 1,44 %, Tris-Base a 0,3 %, metanol a 20 %) gelado por 20 min. Montou-se um sanduíche de papel de filtro-papel Wattman-gel-membrana-papel Wattman-papel de filtro no suporte do aparelho Trans-Blot SD cell (Bio-Rad, CA, USA) ficando o lado do gel no polo negativo e o lado das membranas no polo positivo. A transferência das proteínas para membrana foi feita a 35 mA, por 2 h. A membrana foi corada com Ponceau S para verificar a transferência, sendo posteriormente lavada para remoção do corante e prosseguir com o Imuno-blot.

3.2.7.4.2. Imunoblot utilizando o anticorpo policlonal anti-GST produzido em coelho

Bloquearam-se as membranas transferidas com TSBT (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween 20 a 0,05 %) contendo 1 % de soro albumina bovina (BSA), por 1h à temperatura ambiente sob agitação. Foram lavadas as membranas com TSBT, três vezes, 5 min cada vez, sob agitação. Diluiu-se o anticorpo policlonal anti-GST 1:500 em TSBT/BSA a 1 %. Incubou-se a membrana na solução de anticorpo por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação. Foram lavadas as membranas como descrito anteriormente. Diluiu-se o anticorpo anti-Ig G de coelho, produzido em cabra, conjugado com a enzima fosfatase alcalina, em TSBT/BSA a 1 %. Incubou-se a membrana na solução de conjugado por 1 h à temperatura ambiente sob agitação. Repetiu-se a lavagem por duas vezes mais com tampão de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) para reduzir *background* e para remover o Tween. Secou-se a membrana em papel de filtro e incubou-se a membrana com a solução de substrato (66 µL de NBT + 33 µL de BCIP em 10 mL de tampão da enzima) à temperatura ambiente sob agitação por 15 min. Incubou-se a membrana em água destilada para interrupção da reação enzimática. Secou-se a membrana sobre um pedaço de papel de filtro.

3.2.8. Quantificação das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC

A quantificação das proteínas recombinantes foi feita por método de Lowry (Lowry, *et al.*, 1951).

3.2.9. Teste da atividade antiproliferativa do rIFN- α 2 humano utilizando células da linhagem Daudi

A sensibilidade das células Daudi ao rIFN- α 2 humano foi testada a fim de se determinar a atividade antiproliferativa do rIFN- α 2 a ser usada para os testes de atividade biológica das proteínas recombinantes.

No teste de sensibilidade, a proliferação das células depende do estado fisiológico, da densidade e da viabilidade das células em cultura a serem testadas. A fase estacionária inicial, contendo as células com densidade de 1 a $1,2 \times 10^6$ células/mL, se duplica após aproximadamente 48 horas de cultivo e mostra a melhor resposta ao teste de crescimento (Evinger & Pestka, 1981). Por isso, utiliza-se as células Daudi que se mantém a densidade de 1 a 2×10^6 células/mL e com viabilidade de mais de 98 %. Desta cultura celular, diluiu-se a suspensão para uma densidade de 4×10^5 células/mL.

A sensibilidade do crescimento de células da linhagem Daudi ao rIFN- α 2 foi realizada da seguinte maneira: primeiramente células da linhagem Daudi foram expandidas, e a seguir avaliada sua viabilidade por Azul de Trypan. Após contagem, um número suficiente de células foi centrifugado em tubos de 15 mL, 1.500 rpm, 5 min. à temperatura ambiente. As células centrifugadas foram ressuspensas em meio de RPMI 1640 contendo SBF a 10 % para uma densidade de 4×10^5 células/mL. Em seguida, 100 μ L da suspensão de célula foram distribuídos em cada orifício da placa de fundo chato de 96 orifícios e incubados em estufa de CO₂ a 5 %, 37 °C por 2 h. A seguir, adicionou-se 10 μ L de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 e 32 U de rIFN- α 2 em cada orifício da placa com controle sem rIFN- α 2, e foram incubadas por 3 dias sob as mesmas condições. Após o período de incubação, 25 μ L de MTT (5 mg de MTT/mL de PBS sem Ca ou Mg) (Mosmann, 1983) foram adicionados em cada orifício da placa, e a mesma foi incubada por 3 horas e meia em incubadora de CO₂ a 5 %, a 37 °C. A seguir, adicionou-se 125 μ L de SDS a 10 % em HCl 0,01 N, retornando à incubadora. A absorbância foi obtida utilizando filtro de 595 nm (650 nm de referência) em leitora de ELISA (marca de Spectra, modelo de SLT-spectral). O crescimento das células foi avaliado pelo aumento da absorbância.

O resultado do teste de atividade antiproliferativa foi expresso da seguinte maneira;

% de crescimento de controle

$$= \left\{ \frac{(\text{Abs. da célula tratada com rIFN-}\alpha 2)}{(\text{Abs. do controle da célula})} \right\} \times 100$$

Abs.: Absorbância em 595 nm (650 nm de referência)

3.2.10. Avaliação da atividade bloqueadora da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC sobre atividade antiproliferativa do rIFN- α 2

Utilizando como referência os resultados do teste da sensibilidade apresentado no item 4.8, foram utilizadas 2 U/110 μ L (49 nM) e 1U/110 μ L (24,5 nM) de rIFN- α 2 para avaliação da atividade bloqueadora das proteínas recombinantes.

As células da linhagem Daudi foram expandidas, e sua viabilidade foi avaliada por Azul de Trypan. Após contagem, um número suficiente das células foi centrifugado em tubos de 15 mL, a 1.500 rpm, por 5 min, a temperatura ambiente. Essas foram ressuspensas em meio de RPMI 1640 contendo SBF a 10 % para uma população 4×10^5 células/mL. Em seguida, 100 μ L da suspensão de célula foram distribuídos nos orifícios da placa 96 orifícios de fundo chato e incubada em estufa de CO₂ a 5 %, 37 °C por 2 h. Adicionou-se, então, 10 μ L de uma mistura de 1 U/orifício (ou 2 U/orifício) de rIFN- α 2 com proteína recombinante de diluição seriada, e incubadas previamente por 1 hora em estufa a 5 % de CO₂ a 37 °C. As células foram incubadas por 3 dias sob as mesmas condições. Após o período de incubação, o crescimento das células foi avaliado pelo método colorimétrico de MTT, descrito anteriormente.

O resultado foi expresso da seguinte maneira;

% de crescimento de controle =

$$\left\{ \frac{(\text{Abs. da célula tratada com GST-IFNAR2cEC e o rIFN-}\alpha 2)}{(\text{Abs. do controle da célula})} \right\} \times 100$$

Abs.: Absorbância em 595 nm (650 nm de referência)

Todas determinações foram realizadas em triplicata e cada experimento foi analisado com uma curva padrão de interferon (0, 1, 2, 4 e 8 U) e controle das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC para estabelecer a inibição do crescimento relativa a estes controles.

3.2.11. Teste da atividade antiviral do rIFN- α 2 humano utilizando células Hep 2/c

3.2.11.1. Titulação do vírus EMC por efeito citopático (ECP) nas células Hep 2/c

A suspensão de vírus EMC preparada e estocada no nitrogênio líquido foi titulada pela diluição seriada a fim de escolher um melhor título que causa 100 % do efeito citopático por 25~26 horas.

Em condições assépticas (fluxo laminar), distribuiu-se 3×10^4 células Hep 2/c (volume correspondente a 100 μ L de meio de cultura) por orifício e incubou-se por 24 h a 37 ° C em estufa de CO₂ a 5 %. Verificou-se a formação completa de monocamada das células e retirou-se o meio de cultura. A suspensão de vírus EMC foi diluída seriadamente (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400) em meio RPMI 1640 com 5% de SBF. Adicionou-se o vírus de diluição seriada, contendo 200 μ L de meio em cada orifício onde havia a monocamada das células. Incubou-se por 25 ~26 h nas mesmas condições. Este tempo foi necessário para que o vírus causasse 100 % do efeito citopático. Removeu-se o meio das placas invertendo-as, desprezando todo sobrenadante, adicionou-se 100 μ L de 0,05 % de negro de amido (Meager, 1987) em 9 % com 0,1 M de acetato de sódio por 15 min à temperatura ambiente em capela. A seguir, removeu-se a solução fixadora e lavou-se a placa em água destilada corrente, deixou-se a “face” das placas para baixo sobre um papel absorvente, para secar completamente à temperatura ambiente. Adicionou-se 100 μ L de 0,38 % de NaOH e homogeneizaram-se os cristais de corante, a absorbância foi obtida utilizando filtro de 620 nm, em leitora de ELISA.

O resultado foi expresso da seguinte maneira:

$$\text{ECP (\%)} = \left\{ \frac{(\text{Abs. do controle de vírus})}{(\text{Abs. do controle de célula})} \right\} \times 100$$

Abs.: Absorbância em 620 nm

3.2.11.2. Teste da atividade antiviral do rIFN- α 2 humano utilizando células Hep 2/c

Foram utilizadas 3 diluições do vírus EMC, 1/1000, 1/2.000 e 1/4000 que foi suficiente para causar 100 % do efeito citopático por 25~26 h.

Em condições assépticas (fluxo laminar), o rIFN- α 2 foi diluído em meio RPMI 1640, adicionado em concentrações decrescente (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 U/50 μ L) em cada orifício nas placas de 96 orifícios, distribuíram-se 3×10^4 células Hep 2/c (volume correspondente a 100 μ L de meio de cultura) por orifício, e incubou-se por 24 horas a 37 ° C em estufa de CO₂ a 5 %. Verificou-se a formação completa de monocamada das células e retirou-se o meio de cultura. Adicionou-se o vírus da diluição 1/2.000 onde houve 100 % de efeito citopático no controle de vírus, contendo 200 μ L de meio. Incubou-se por 25~26 horas a 37 ° C em estufa de CO₂ a 5 %. Este tempo foi necessário para que a monocamada do controle de vírus fosse lisada completamente. Removeu-se o meio das placas invertendo-as, desprezando todo sobrenadante. A seguir, a monocamada das células foi submetida a coloração já descrita, no item anterior.

O resultado foi expresso da seguinte maneira:

$$\text{ECP (\%)} = \left\{ \frac{(\text{Abs. do controle de vírus})}{(\text{Abs. da célula tratada com rIFN-}\alpha 2 \text{ e com vírus})} \right\} \times 100$$

Abs.: Absorbância em 620 nm

Todas as determinações foram tomadas em triplicata, e os controles da célula e do vírus assim como branco (só meio) foram analisados.

3.2.12. Avaliação da atividade bloqueadora das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC sobre atividade antiviral do rIFN- α 2

Baseado no teste da sensibilidade das células de linhagem Hep 2/c infectadas por vírus de EMC à atividade antiviral do rIFN- α 2 foram utilizadas 8 U, 4 U, 2 U e 1 U e o vírus de diluição de 1/2.000.

Adicionou-se 1U (ou 8 U, 4 U ou 2 U) de rIFN- α 2 e a proteína recombinante em concentração seriada (420 nM, 42 nM, 4,2 nM, 0,42 nM e 0,042 nM) em orifício da placa contendo volume final de 50 μ L e incubou-se

por 1~2 h em estufa de CO₂ a 5 % a 37 ° C. Adicionou-se 100 µL contendo 3 x 10⁴ células Hep 2/c por orifício, e incubou-se por 24 horas na mesma condição. Verificou-se a formação completa de monocamada das células e retirou-se o meio de cultura. Adicionou-se o vírus da diluição 1/2.000 no volume final de 200 µL de meio. Incubou-se por 25~26 horas a 37 ° C em estufa de CO₂ a 5 %. A seguir, removeu-se o meio das placas invertendo-as, desprezando todo sobrenadante. A seguir, a monocamada das células foi submetida a coloração já descrita, no item anterior.

O resultado foi expresso da seguinte maneira:

$$\text{ECP (\%)} = \left\{ \frac{(\text{Abs. do controle de vírus})}{(\text{Abs. da célula tratada com rIFN-}\alpha 2, \text{ proteína recombinante e vírus})} \right\} \times 100$$

Absorbância em 620 nm

Todas as determinações foram tomadas em duplicata, sendo que em cada ensaio foram realizados controles de células com IFN e sem IFN, assim como controle de vírus com IFN e sem IFN, e controle do receptor recombinante para avaliar a sua influência na inibição da atividade de vírus.

3.2.13. Avaliação da expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS, utilizando células da linhagem Daudi e Hep 2/c estimuladas com rIFN- α 2.

3.2.13.1. Obtenção das células após o tratamento com rIFN- α 2

As células Daudi e Hep 2/c foram utilizadas para RT-PCR. Após a verificação da viabilidade (>98 %) e a contagem, um número suficiente de células foi centrifugado em tubos de 15 mL, a 1.500 rpm, por 5 min, a temperatura ambiente. Essas células foram ressuspensas em meio apropriado contendo SBF a 10 % para uma população 1 x 10⁶ células/mL (Para as células Hep 2/c que são células aderentes, foram usados 5 x 10⁵ células /mL). 1 mL da suspensão de células foram distribuídos em cada orifício da placa de fundo chato de 24 orifícios e incubadas em estufa de CO₂ a 5 % a 37 ° C por 2 h. Adicionou-se, então, 100 µL de rIFN- α 2 em diferentes concentrações (0, 0,1, 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1.000 U). As células foram incubadas por 4 h sob as mesmas condições. Após o período

de incubação, as células Daudi foram submetidas diretamente à extração de RNA total.

3.2.13.2. Escolha dos iniciadores para RT-PCR

As seqüências dos iniciadores para STAT 1 foram selecionadas com base na descrição do GenBank: número de acesso-NM007315. O iniciador 5' foi constituído de 19 nucleotídeos (313-331) da seqüência do gene STAT1. O iniciador 3' foi constituído 22 nucleotídeos (699-678) da seqüência complementar do gene STAT 1.

As seqüências dos iniciadores 2', 5'-OAS (69 kDa) foram selecionadas de acordo com o trabalho de Dondi e cols (2001), tendo base na descrição do GenBank: número de acesso-NM016817.1. O Iniciador 5' foi constituído de 20 nucleotídeos (1157-1176) da seqüência do gene 2', 5'-OAS (69 kDa). O Iniciador 3' foi constituído 19 nucleotídeos (1361-1343) da seqüência complementar do gene 2', 5'-OAS (69 kDa). A seqüência dos iniciadores foi reavaliada pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) a fim de confirmar 100 % de homologia com a seqüência do gene 2',5-OAS. As seqüências dos iniciadores estão mostradas a seguir e as temperaturas de desnaturação (Tm) foram determinadas pelo programa OLIGO.

STAT 1 : Iniciador 5' (19 bp, 52 % de GC, Tm = 50 ° C)

5' AAA GCA AGA CTG GGA GCA C 3'

Iniciador 3' (22 bp, 40 % de GC, Tm = 49 ° C)

5' TCT TGT AAA TCT TCC AGG CTC T 3'

2', 5'-OAS : Iniciador 5' (20 bp, 45 % de GC, Tm = 51,4 ° C)

5' AAC TGC TTC CGA CAA TCA AC 3'

Iniciador 3' (19 bp, 52 % de GC, Tm = 52,9 ° C)

5' CCT CCT TCT CCC TCC AAA A 3'

3.2.13.3. Extração do RNA total

O RNA total foi isolado, utilizando o kit NucleoSpin RNA da marca CLONTECH. Conforme a recomendação de fabricantes, as células foram lisadas na solução que continha tiocianato de guanidina e o RNA total foi isolado pela membrana de sílica e eluído com a adição da água livre de

RNase. O kit permite o isolamento do RNA total altamente puro das células sem utilização de fenol e clorofórmio.

O RNA total foi extraído também, utilizando-se 1 mL do reagente TRIZOL[®] (Invitrogen Life Technologies, Carisbad, CA, USA), baseado no método de Chomczynsky & Sacchi (1987). De acordo com o protocolo do fabricante, as amostras foram homogeneizadas com 1 mL do reagente TRIZOL[®], seguidas da adição de 0,2 mL de clorofórmio, homogeneizou-se e centrifugou-se a 12.000 x *g*, por 15 min, a 4 °C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado, centrifugado a 12.000 x *g*, por 10 min, 4 °C e lavado com etanol 75 % (v/v). A seguir, o RNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL de água estéril tratado com DEPC e incubado por 10 min a 56 °C e armazenado a -70 °C para posterior análise.

3.2.13.4. Quantificação do RNA total

O RNA total isolado foi quantificado por espectrofotometria na região UV, em 260 nm e 280 nm, utilizando-se o aparelho Beckman DU 640, após diluição das amostras 1: 10 em água estéril tratada com DEPC. A pureza do RNA total foi verificada pela relação da absorbância 260/280 nm.

3.2.13.5. Síntese do cDNA por transcrição reversa (RT)

O RNA total previamente isolado e quantificado foi utilizado como molde para a síntese do cDNA pela ação da transcriptase reversa (RT). A síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada utilizando-se o kit SuperScript[™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technologies), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Desta forma, em tubo de microcentrífuga de 0,2 mL pipetou-se a solução de RNA total contendo 0,35 µg, 50 ng de oligohexamero randômico, dNTP a 10 mM e completou-se com água tratada com DEPC para 10 µL. Os tubos foram homogeneizados, brevemente centrifugados e submetidos a 65 °C por 5 min para desnaturação do RNA e em seguida, resfriada em banho de gelo. Centrifugou-se brevemente e acrescentou-se 9 µL da seguinte mistura de reagentes: tampão da enzima RT (10X concentrado [Tris-HCl (pH 8,4) a 200

mM, KCl a 500 mM], $MgCl_2$ a 25 mM, DTT a 0,1 M e 40 U de inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT. Essa mistura final foi submetida a 25 °C por 2 min. A seguir, acrescentou-se 50 U/·L de SuperScriptII RT e incubou-se a 25 oC por 10 min. para permitir hibridação dos oligonucleotídeos aleatórios (hexamero randômico) ao RNA, seguida de 50 min. a 42 oC para ação da enzima RT e 15 min. a 70 oC para desativação da enzima. A seguir, os tubos foram resfriados no gelo e brevemente centrifugados. A seguir, acrescentou-se 2 U/·L de RNase H e incubou-se a 37 oC por 20 min. para remoção do RNA do híbrido de cDNA:RNA. A remoção desse RNA aumenta a sensibilidade de PCR posterior).

3.2.13.6. Amplificação do cDNA alvo pela PCR

3.2.13.6.1. Amplificação do cDNA da 2', 5'-OAS (67 kDa) pela PCR

A reação de amplificação do cDNA foi composta de tampão [Tris-HCl 75 mM, pH 9; KCl 50 mM; $MgCl_2$ 2,0 mM e $(NH_4)_2 SO_4$ 20 mM], dNTP 200 nM, cada iniciador de 2', 5'-OAS 200 nM e 1 U de *Tth* DNA polimerase®, adicionados aos microtubos de 0,2 mL. Em seguida, foram pipetadas as amostras, 2 µL de cDNA e o volume completado para 50 µL com água estéril. Os tubos com os reagentes foram homogeneizados e colocados no termociclador PTC-200 MJ Research, Inc. (Lab. Trade do Brasil). Foram programados da seguinte forma; desnaturação inicial (*hot start*): 94 °C por 3 min.; amplificação: 25 - 40 ciclos de amplificação de 94 °C por 1 min. (desnaturação), 53 °C ou 55 °C por 1 min. (hibridação) e de 72 °C por 1 min. (polimerização); polimerização final: 72 °C por 10 min. Ao final dos ciclos de amplificação a reação foi interrompida por esfriamento a 4 °C.

3.2.13.6.2. Amplificação do cDNA do STAT 1 pela PCR

A amplificação do cDNA do STAT 1 pela PCR foi realizada segundo descrito no item 3.2.13.6.1. exceto os iniciadores e a temperatura de hibridação. Foram utilizados os iniciadores do STAT 1 e a temperatura de hibridação foi 55 °C.

3.2.13.6.3. Amplificação do cDNA do gene *housekeeping* (constitutivos) GAPDH pela PCR

A amplificação do cDNA do gene GAPDH pela PCR foi realizada segundo descrito no item 3.2.13.6.1. exceto os iniciadores. Foram utilizados os iniciadores do gene GAPDH e a temperatura de hibridação foi 55 °C.

3.2.13.6.4. PCR-duplex

Com o objetivo de diminuir ao máximo a diferença da pipetagem entre os experimentos e o tempo de ensaio na avaliação gênica do STAT 1 e 2', 5'-OAS, foi realizada PCR-duplex, ou seja, PCR conjunta de dois genes (gene de interesse com o gene *housekeeping* GAPDH).

3.2.13.6.4.1. Amplificação conjunta do cDNA da 2', 5'-OAS e da GAPDH pela PCR

As condições de amplificação foram semelhantes ao item 3.2.13.6.1. exceto os iniciadores, a concentração dos iniciadores e a concentração de dNTP. Foram adicionados os iniciadores de 2', 5'-OAS a 200 nM e os iniciadores de GAPDH a 50 nM, 100 nM ou 200 nM e dNTP a 400 nM (dobro do volume usado no item 3.2.13.6.1).

3.2.13.6.4.2. Amplificação conjunta do cDNA do STAT 1 e da GAPDH pela PCR

As condições de amplificação foram iguais ao item 3.2.13.6.4.1. exceto os iniciadores. Foram utilizados os iniciadores do STAT 1 a 200 nM e os iniciadores de GAPDH a 50 nM, 100 nM ou a 200 nM.

3.2.13.7. Avaliação eletroforética dos produtos de amplificação

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5 % ou 2 %, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), adicionando-se 2 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25 %, xilenocianol-FF a 0,25 % e lícero a 30 %) a 7 µL de produto de PCR, aplicando-se no gel e submetendo-se a eletroforese em tampão TBE (Tris-HCl a 0,45 mM, ácido bórico a 0,45 mM e EDTA a 2,5 mM, pH 8,0) por 40-50 min. a 100 V. A visualização dos fragmentos de DNA foi feita em transluminador sob luz UV,

utilizando-se como referência um marcador de pares de base de 100 bp. A imagem do gel foi capturada utilizando o sistema de fotodocumentação Multimage™ Light Cabinet (Alphatech, San Leandro, CA, USA).

3.2.13.8. Medida semiquantitativa da expressão gênica da 2', 5'-OAS e do STAT1

Ao final da separação eletroforética foi realizada análise densitométrica utilizando o programa Chemilmager™ ready do equipamento Multimage™ Light Cabinet. A amplificação do gene *housekeeping* GAPDH foi utilizada para o cálculo da expressão relativa, pelo fato do referido gene ser expresso de forma constante e abundante nas células de mamíferos. A medida da expressão do mRNA da 2', 5'-OAS e do STAT 1 foi obtida em valores relativos (expressão relativa) entre a densidade óptica do produto de amplificação da 2', 5'-OAS ou do STAT 1 e a densidade óptica do produto de amplificação da GAPDH.

3.2.13.9. Controle de qualidade das técnicas de RT-PCR

As amplificações realizadas pela técnica de PCR, foram monitoradas utilizando-se controle de reagentes (tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto cDNA) em cada conjunto de reações.

3.2.14. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão gênica da 2', 5'-OAS e do STAT 1 nas células Daudi e Hep 2/c

A partir dos resultados da otimização do item 3.2.13., utilizaram-se 1 U e 10 U de rIFN- α 2, 26 ciclos de amplificação e 28 ciclos de amplificação para avaliação da expressão gênica do mRNA da 2', 5'-OAS e do STAT 1, respectivamente, com as células Daudi. Para as células Hep 2/c, utilizou-se 10 U e 20 U de rIFN- α 2, 32 ciclos de amplificação e 27 ciclos de amplificação para avaliação da expressão gênica do mRNA da 2', 5'-OAS e do STAT 1 respectivamente.

Foram utilizadas temperatura de hibridação de 55° C e concentração dos iniciadores da GAPDH a 100 nM e dos STAT 1 e 2', 5'-OAS a 200 nM.

Os métodos utilizados foram semelhantes ao item 3.2.13. exceto o item 3.2.13.1.

3.2.14.1. Obtenção das células após o tratamento com rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC

As células Daudi e Hep 2/c foram utilizadas para avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão gênica dos 2', 5'-OAS e STAT 1. Após a verificação da viabilidade (>98 %) e a contagem, um número suficiente de células foi centrifugado em tubos de 15 mL, a 1.500 rpm, por 5 min, a temperatura ambiente. Essas células foram ressuspensas em meio apropriado contendo SBF a 10 % para uma população 1×10^6 células/mL (Para as células Hep 2/c que são células aderentes, foram usados números de células 5×10^5 /mL). 1mL da suspensão de células foram distribuídos em cada orifício da placa de fundo chato de 24 orifícios e incubadas em estufa de CO₂ a 5 % a 37 °C por 2 h. Adicionou-se, então, 100 μ L de uma mistura de 1 U/orifício (ou 10 U ou 20 U) de rIFN- α 2 com proteína recombinante de diluição seriada (420 nM, 42 nM, 4,2 nM e 0,42 nM), e incubadas previamente por 1 hora em estufa a 5 % de CO₂ a 37 °C. As células foram incubadas por 4 h sob as mesmas condições. Após o período de incubação, as células foram submetidas diretamente à extração de RNA total.

Como controle, foi analisada também a expressão gênica da 2', 5'-OAS em células tratadas apenas com rIFN- α 2, ou com GST-IFNAR2cEC, com GST ou com GST mais rIFN- α 2.

3.2.15. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico, correlação de Spearman, sendo considerado o valor de $p \leq 0,05$, como significante (ROSNER, 1986).

4. RESULTADOS

4.1. Subclonagem do fragmento de DNA do IFNAR2cEC nos vetores de expressão pRSET A e pGEX 4T-2

4.1.1. Extração e clivagem do plasmídeo pZipBetaL

A figura 12 mostra o plasmídeo pZipBetaL extraído das *E.coli* DH5 α transformadas e clivado com *Bam*HI, confirmando a presença do fragmento de DNA que codifica para a IFNAR 2c com tamanho esperado (1.548 bp).

4.1.2. Produção do fragmento de DNA que codifica para a região do domínio extracelular da IFNAR 2c (IFNAR2cEC) pela PCR

Na coluna 3 da figura 12 o produto PCR, ou seja, o fragmento de DNA do IFNAR2cEC apresentou o tamanho esperado de 747 bp.

4.1.3. Subclonagem do fragmento de DNA do IFNAR 2cEC nos vetores de expressão pRSET A e pGEX 4T-2

Na coluna 4 das figuras 13A e 13 B, o fragmento resultante da clivagem com *Bam*HI e *Eco*RI com tamanho de 747 bp (entre 650 bp e 850 bp) confirmou a presença do inserto (IFNAR2cEC) no vetor.

Figura 12. Fotografia do gel de agarose a 0,8 %, após a separação eletroforética e a coloração com brometo etídeo dos plasmídeos e do produto da PCR. Coluna Pd, Marcador de pares de base de DNA 1Kb PLUS; Coluna 1, pZipBetaL (pZipNeoSVX contendo o fragmento de DNA da IFNAR 2c; Coluna 2, pZipBetaL clivado com *Bam*HI.; Coluna 3, Produto de PCR correspondente ao IFNAR2cEC (747 bp).

Figura 13. Fotografia do gel de agarose a 0,8 % após a separação eletroforética e a coloração com brometo etídeo dos plasmídeos recombinantes pRSET-IFNAR2cEC (A) e pGEX-IFNAR2cEC (B). Coluna Pd, Marcador de pares de base de DNA 1Kb PLUS; Coluna 1, pRSET A (2,9 kb) (A) ou pGEX4T-2 (4,9 kb)(B) clivado e linearizado com *Bam*HI e *Eco*RI; Coluna 2, IFNAR2cEC (inserto, 747 bp) clivado com *Bam*HI e *Eco*RI; Coluna 3, pRSET-IFNAR2cEC (A) ou pGEX-IFNAR2cEC (B) clonado e circular; Coluna 4, pRSET-IFNAR2cEC (A) ou pGEX-IFNAR2cEC (B) clivado com *Bam*HI e *Eco*RI.

Tabela 4. Resultado da clonagem, mostrando número de colônias transformadas obtidas na clonagem e número de colônias com plasmídeo clonado com inserto.

Plasmídeo recombinante	Incubação para reação de ligação	Célula (<i>E. coli</i>) hospedeira	No. de Transformadas	Colônias Triadas	Com inserto
pGEX-IFNAR2cEC	16 °C, 16 h	DH5 α	13	13	5
	25 °C, 1h	DH5 α	15	15	2
pRSET - IFNAR2cEc	16 °C, 16 h	BL21 (DE3)	> 100	14	2

A tabela 4 mostra o número de colônias transformadas obtidas na clonagem e o número de colônias com plasmídeo contendo inserto.

Com a incubação a 16 °C por 16 h, que é a recomendada para T4 DNA ligase pelo fabricante, foram obtidas 13 colônias transformadas, das quais 5 apresentaram resultado positivo para o inserto, estes clones foram denominados de pGEX-IFNAR2cEC. Com o objetivo de diminuir o tempo de incubação, testou-se a incubação de 25 °C/1h. Com a incubação de 25 °C/1h foram obtidas 15 colônias, das quais 2 apresentaram resultado positivo para o inserto. Verificou-se que um maior tempo (16 h) de incubação resultou em maior número das colônias que apresentaram o plasmídeo recombinante. Porém, a incubação de 25 °C/1h permitiu obtenção de resultado mais rápido.

Na reação de ligação entre o inserto e o plasmídeo pRSET com incubação a 16 °C por 16 h foram obtidas mais de 100 colônias transformadas. Pesquisou-se em 14 colônias aleatoriamente escolhidas pela PCR da presença do fragmento clonado e somente 2 apresentaram resultado positivo para o inserto, estes clones foram denominados de pRSET-IFNAR2cEC

4.2. Expressão da proteína recombinante do domínio extracelular da IFNAR 2c (IFNAR2cEC) em *E. coli*

4.2.1. Expressão protéica utilizando as células transformadas *E. coli* BL21(DE3) com o pRSET-IFNAR2cEC

Não houve a expressão protéica da *E. coli* BL21(DE3) transformada com o pRSET-IFNAR2cEC em todas as colônias que continham os plasmídeos recombinantes. A figura 14 mostra os resultados do perfil protéico após a expressão. O perfil de expressão protéica entre T₀ (antes de indução) e T₁, T₂, T₃ e T₄ (1, 2, 3 e 4 h após a indução) não mostrou diferença, confirmando ausência de expressão quando comparado com células transformadas com pRSET A (Sem inserto)

Figura 14. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5 % corado com Coomassie Blue para análise da expressão protéica do pRSET-IFNAR2cEC em *E. coli* BL21(DE3). Coluna M: marcador do peso molecular da proteína. Coluna T₀, antes de indução de IPTG, Coluna T₁, T₂, T₃ e T₄, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h após a indução com IPTG.

4.2.2. Expressão protéica utilizando as células transformadas *E. coli* BL21(DE3)pLysS com o pRSET-IFNAR2cEC

Como não houve a expressão protéica com cepa *E. coli* BL21(DE3) transformada com o pRSET-IFNAR2cEC, utilizou-se a cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS, a qual mantém melhor estabilidade do plasmídeo recombinante. Como se pode observar na figura 15, a cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS também não apresentou a expressão da proteína recombinante IFNAR2cEC (28 kDa). Portanto, efetuou-se a nova clonagem no pRSET A com o inserto obtido do pGEX-IFNAR2c da colônia 2, na qual já se havia obtido ótima expressão da proteína recombinante (Figura 16), mas os resultados foram negativos, não apresentando a expressão da proteína recombinante.

Figura 15. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5 % corado com Coomassie Blue para análise da expressão protéica do pRSET-IFNAR2cEC em *E. coli* BL21(DE3)pLysS Coluna M: marcador do peso molecular da proteína; Coluna T₀, antes de indução de IPTG, Coluna T₁, T₂ e T₃, 1 h, 2 h e 3 h após a indução com IPTG.

4.2.3. Expressão protéica utilizando as células transformadas *E. coli* DH5 α com o pGEX-IFNAR2cEC

A figura 16 mostra a expressão protéica da *E. coli* DH5 α transformadas com o pGEX-IFNAR2cEC. Apresentou-se uma ótima expressão da proteína em fusão que denominou-se GST-IFNAR2cEC. O sistema de expressão *E. coli* DH5 α /pGEX-IFNAR2cEC resultou na produção de alta quantidade da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC, a partir de 1 hora após a indução com IPTG a 0,1 mM.

A análise de parâmetro físico-químico da proteína de fusão no programa EXPASY (<http://www.expasy.ch>) indica que a proteína de fusão GST-IFNAR2cEC apresenta peso molecular 54 kDa e seu ponto isoelétrico é 5,41. Como pode se observar na figura 16, a proteína recombinante GST-IFNAR2cEC apresentou o peso molecular esperado.

Figura 16. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5 % corado com Coomassie Blue para análise da expressão protéica do pGEX-IFNAR2cEC em *E. coli* DH5 α . A colônia transformada com pGEX-IFNAR2cEC (CpGEX-IFNAR2cEC) e a colônia transformada só com pGEX (CpGEX) (controle negativo) foram submetidas à expressão protéica com a indução com IPTG. Coluna M, marcador do peso molecular da proteína, Coluna T₀, sedimento celular antes da indução de IPTG; Coluna T₁, T₂, T₃ e T₄, sedimento celular 1, 2 h, 3 h e 4 h após a indução com IPTG. As setas indicam as proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC (54 kDa) e GST (26 kDa).

4.3. Isolamento da proteína recombinante de fusão GST-IFNAR2cEC

4.3.1. Isolamento da proteína recombinante utilizando sonicação para lise celular

A figura 17 mostra o isolamento da proteína recombinante pela sonicação. Após a primeira sonicação as proteínas bacterianas apresentaram-se, em geral, solúveis, presente no sobrenadante. A proteína recombinante GST-IFNAR2cEC permaneceu no sedimento apesar da sonicação ter sido repetida por três vezes.

Figura 17. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida 12,5 % corado com Coomassie Blue dos resultados do isolamento das proteínas recombinantes por sonicação. O sedimento celular obtido 3 h após a indução protéica com IPTG a 37 °C foi lisado pela sonicação. Coluna M, marcador do peso molecular da proteína; Coluna T₃, sedimento celular obtido 3 h após a indução com IPTG; Coluna S1, sobrenadante da 1^a sonicação; Coluna S2, sobrenadante da 2^a sonicação; Coluna S3, sobrenadante da 3^a sonicação; Coluna P, sedimento (*pellet*) obtido após de 3^a sonicação.

4.3.2. Isolamento da proteína recombinante pela ruptura de células por *French Press*

A figura 18 mostra o isolamento da proteína recombinante com ruptura de bactérias pela *French Press*. A figura 18A mostra o isolamento da proteína do sedimento celular que foi obtido 3 horas após a indução com IPTG a 0,1 mM a 37 °C. Após a lise celular pela *French Press*, as proteínas bacterianas foram, em geral solúveis, presente no sobrenadante. As demais proteínas bacterianas e a proteína recombinante GST-IFNAR2cEC permaneceram insolúvel presente no sedimento. A figura 18B mostra o isolamento da proteína do sedimento celular que foi obtido 3 hs após a indução com IPTG a 25 °C. A indução com IPTG a 25 °C resultou em menor rendimento da proteína recombinante expressa quando foi comparado com o rendimento da proteína expressa a 37 °C. Porém, a solubilidade da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC aumentou significativamente. Aproximadamente 2/3 da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC encontra-se no sobrenadante e apenas 1/3 no sedimento. A maioria das proteínas bacterianas solubilizou no meio aquoso.

Figura 18. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12,5 % corado com Coomassie Blue dos resultados do isolamento da proteína recombinante por *French Press*. O sedimento celular obtido 3 h após a indução protéica com IPTG a 37 °C (A) ou a 25 °C (B) foi lisado pela *French Press*. Coluna M, marcador do peso molecular da proteína. Coluna T₀, sedimento celular antes da indução de IPTG, Coluna T₃, sedimento celular obtido 3 h após a indução com IPTG; Coluna S, sobrenadante após a lise celular pela *French Press* Coluna P, o sedimento (*pellet*) após a lise celular pela *French Press*. As setas indicam as proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC (54 kDa).

4.3.3. Isolamento da proteína recombinante pelo kit BugBuster®

A figura 19 mostra a extração da proteína do sedimento celular que foi obtido 3 horas após a indução com IPTG a 25 °C pelo kit BugBuster. Após a lise celular pelo kit BugBuster, as proteínas bacterianas foram, em geral, solúveis presente no sobrenadante e as demais proteínas bacterianas, incluindo a proteína recombinante GST-IFNAR2cEC permaneceram no sedimento

Figura 19. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12,5 % corado com Coomassie Blue dos resultados do isolamento da proteína recombinante que foi obtida 3 hs após a indução com IPTG a 25 °C pelo kit BugBuster. Coluna M, marcador do peso molecular da proteína; Coluna T₀, sedimento celular antes da indução de IPTG, Coluna T₃, sedimento celular obtido 3 h após a indução com IPTG; Coluna S, sobrenadante após a lise celular pelo kit BugBuster; Coluna P, o sedimento (*pellet*) após a lise celular pelo kit BugBuster. As setas indicam as proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC.

4.4. Estudo para obtenção da proteína solúvel.

A proteína recombinante GST-IFNAR2cEC ao ser expressa em *E. coli* a 37 °C formou corpos de inclusão (Figura 17, 18A). Para minimizar a formação de corpo de inclusão, realizaram-se várias modificações no procedimento da expressão, incluindo indução em menor temperatura, coexpressão com chaperonina, uso de detergente não-iônico no tampão de lise celular e outros (Schein, 1991, Makrides *et al.*, 1996). Neste estudo para obtenção da proteína solúvel, minimizando a formação de corpos de inclusão, avaliaram-se as seguintes estratégias descritas na tabela 5. Além disso, testaram-se diferentes pH de tampão de lise celular (pH 7, pH 7,5, pH 8, pH 9) e observou-se que o pH não influenciou a solubilidade da proteína recombinante (Dados não apresentados).

Tabela 5. Estratégias realizadas para obtenção da proteína solúvel GST-IFNAR2cEC, minimizando a formação de corpos de inclusão

	Temperatura da indução com IPTG	Métodos para lise celular	Forma da proteína recombinante	Figura apresentada
Expressão de GST-IFNAR2cEc	37 °C	Sonicação	Insolúvel	Figura 17
	37 °C	French Press	Insolúvel	Figura 18A
	25 °C	Sonicação	Insolúvel	-
	25 °C	French Press	Solúvel	Figura 18B
	25 °C	Uso do kit BugBuster	Insolúvel	Figura 19
Coexpressão com chaperonina GroEL/ES	37 °C	Sonicação	Insolúvel	Figura 20

Na tabela 5, pode-se observar que a formação de corpos de inclusão reduziu quando a proteína recombinante foi expressa a 25 °C e a lise celular com *French Press* inibiu agregação da proteína. Observou-se que a sonicação não é um sistema adequado para a extração da proteína recombinante solúvel devido ao aquecimento da proteína que pode causar a sua desnaturação. Esta suposição foi mostrada quando se realizou a lise pela sonicação, utilizando mistura obtida da expressão a 25 °C. Por outro

lado, a lise celular utilizando *French Press* não afetou a desnaturação da proteína recombinante, liberando ao máximo a proteína solúvel expressa. A temperatura de 25 °C favoreceu na formação da proteína solúvel (Figura 18B) quando comparado com a expressão a 37 °C (Figura 18A). O uso do kit BugBuster não mostrou eficiente na liberação da proteína recombinante solúvel (Figura 19).

4.5. Coexpressão com chaperonina GroEL/ES

A chaperonina GroEL/ES foi expressa em duas proteínas de peso molecular 60 kDa e 14 kDa. A coluna T₃ da figura 20 mostra a coexpressão das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC e chaperonina GroEL/ES. Após a lise celular pela sonicação, a chaperonina GroEL/ES apresentou solubilidade com sua presença no sobrenadante (Coluna S1) e a proteína recombinante GST-IFNAR2cEC permaneceu no sedimento insolúvel. A figura 20 mostra que a chaperonina não foi eficaz na solubilização da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC.

Figura 20. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12,5 % corado com Coomassie Blue dos resultados do isolamento das proteínas recombinantes que foram coexpressas com a chaperonina GroEL/ES por sonicação. Coluna M, marcador do peso molecular da proteína; Coluna T₃, sedimento celular obtido 3 h após a indução com IPTG; Coluna S1, sobrenadante da 1^a sonicação; Coluna S2, sobrenadante da 2^a sonicação; Coluna S3, sobrenadante da 3^a sonicação; Coluna P, sedimento (*pellet*) obtido após de 3^a sonicação.

4.6. Purificação da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC

A figura 21 mostra a fotografia do gel, ilustrando as etapas de purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade com Glutathiona-sepharose, após a indução com IPTG a 25 ° C por 3 h e lise celular com *French Press*. Após a ligação com resina Glutathiona-sepharose eluiu-se com glutathiona reduzida, obtendo-se os eluatos 1 (E1), 2 (E2) e 3 (E3) que mostraram presença de uma banda de IFNAR2cEC-GST, contendo proteína de peso molecular de 54 kDa. Após a ultrafiltração através de Centricon-50, o rendimento da proteína GST-IFNAR2cEC purificada foi de aproximadamente 1,5 - 2 mg por litro de cultura de células.

Figura 21. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12,5 % corado com Coomassie Blue, para análise dos procedimentos de purificação das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC. Coluna M, marcador do peso molecular da proteína (Gibco); Coluna T₀, sedimento celular antes de indução com IPTG; T₃, sedimento celular obtido 3 h após a indução com IPTG a 25 ° C; Coluna S, fração protéica solúvel (sobrenadante) após a lise celular pela *French Press*; Coluna E1, E2 e E3, 1º, 2º e 3º eluato, após a purificação com resina de afinidade Glutathiona-Sepharose e eluição com glutathiona reduzida.

4.7. Clivagem da GST-IFNAR2cEC com trombina

A figura 22A mostra a fotografia do gel de eletroforese com os resultados da clivagem com trombina da proteína de fusão ligada à resina. Apesar de usar uma quantidade recomendada de trombina (50 U para 2 mL de Glutathiona-sepharose a 50 %), observou-se que cerca de 50 % da IFNAR2cEC-GST não foi clivada (54 kDa). Os sobrenadantes de 2h, 4h e de

16h após a reação com trombina não continham IFNAR2cEC (Coluna S2, S4 e S16 da figura 22A). Verificou-se que a proteína clivada IFNAR2cEC (28 kDa) não foi liberada da resina, permanecendo ligada (Coluna R da figura 22A). Foram observadas bandas de peso molecular, 37 kDa, 26 e 24 kDa. Provavelmente a banda de 37 kDa é a própria trombina, confirmado com o perfil da trombina no PAGE-SDS que apresentou este peso molecular. A proteína de 26 kDa é a da GST. Entretanto, a proteína de 24 kDa foi inesperada. Para esclarecer esta dúvida, foi feita a eluição com glutathiona reduzida com amostra correspondente à coluna R da figura 22A. As colunas E1, E2 e E3 da figura 22B mostram o perfil dos eluatos após a reação com glutathiona reduzida. Foram observadas nos eluatos proteínas de 24 kDa e de 26 kDa, mostrando ser a GST. Isto foi confirmado através da Western Blot e Imuno Blot, utilizando anticorpo policlonal anti-GST produzido em coelho (Figura 22C).

A figura 23A mostra a fotografia do gel com os resultados da clivagem com trombina, utilizando a proteína GST-IFNAR2cEC após eluição da resina. Foram observadas várias bandas inespecíficas após a reação com trombina a partir de 2 h, como foi observado anteriormente na clivagem com trombina da proteína de fusão IFNAR2cEC-GST ligada na resina (Coluna R da figura 22A). Conforme recomendação do fabricante (Amersham Pharmacia, Chang, 1985), pesquisou-se a seqüência de aminoácidos na IFNAR2cEC se havia presença de sítio de clivagem para trombina. Porém, não foi encontrado o sítio de clivagem na seqüência de aminoácidos da IFNAR2cEC. Não é conhecida a origem destas bandas inespecíficas, pois a proteína GST-IFNAR2cEC tem sido caracterizada como estável, não sofrendo a degradação durante o processo de purificação. Na figura 23A, observa-se que após 16 h de reação com trombina, a banda de 54 kDa é mais fraca do que as bandas de 2h, 4h e 6h, mostrando que um maior tempo de incubação aumenta a clivagem da IFNAR2cEC-GST pela trombina. Após a clivagem por 16 h, essa mesma amostra foi incubada com a resina e centrifugada para separar o sobrenadante e a resina. A figura 23B mostra a fotografia eletroforética do perfil protéico dos sobrenadante e a resina. Somente na resina foram observadas duas bandas de GST de 24 kDa e 26 kDa.

Assim, como foi citado, foram encontradas várias dificuldades acima para obtenção de IFNAR2cEC por meio de clivagem com trombina. Não foi possível ainda obter a IFNAR2cEC em boa quantidade de modo puro para avaliação da sua atividade biológica.

Figura 22. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5% corado com coomassie Blue (A e B) e do Imuno Blot, para análise de procedimentos de clivagem com trombina, utilizando a GST-IFNAR2cEC ligada na Glutathione-Sepharose.

Figura 22A: O perfil eletroforético da clivagem com trombina por 2 h, 4h e 16 h, utilizando a GST-IFNAR2cEC ligada na resina. Coluna M, marcador do peso molecular da proteína (GibcoBRL); coluna S₂, S₄ e S₁₆, sobrenadantes 2h, 4h e 16 h após a reação com trombina; coluna R, a resina 16 h após a reação com trombina.

Figura 22B: O perfil eletroforético após a ligação com Glutathione-Sepharose e a eluição com glutathione reduzida, utilizando a amostra da coluna R da figura 22A. Coluna E1, E2 e E3, 1º, 2º e 3º eluato.

Figura 22C: O perfil eletroforético após Western Blot e Imuno Blot com anticorpo policlonal anti-GST produzido em coelho, utilizando a amostra da coluna R da figura 22A

Figura 23. Fotografia do gel de eletroforese em SDS-poliacrilamida a 12, 5% corado com coomassie Blue (A e B), para análise de procedimentos de clivagem com trombina, utilizando a GST-IFNAR2cEC eluída da resina Glutathione-sepharose.

Figura 23A: O perfil eletroforético da clivagem com trombina por 2 h, 4h, 6h e 16 h, utilizando a GST-IFNAR2cEC eluída da resina. Coluna M, marcador do peso molecular da proteína (GibcoBRL); coluna T₂, T₄, T₆ e T₁₆, 2h, 4h, 6h e 16 h após a reação com trombina.

Figura 23B: O perfil eletroforético da ligação com Glutathione-Sepharose, utilizando a amostra da coluna T₁₆ da figura 23A. A GST-IFNAR2cEC incubada com trombina por 16 h foi submetida à ligação com Glutathione-Sepharose por 1h e o resultante foi centrifugada. Coluna S, sobrenadante após a centrifugação; coluna R, resina após a centrifugação.

4.8. Teste de sensibilidade das células de linhagem Daudi ao rIFN- α 2

A figura 24 mostra a resposta da proliferação celular da linhagem Daudi na presença de rIFN- α 2. O crescimento das células foi inibido 47 % com 1 U/110 μ L de rIFN- α 2 e na presença do 32 U/110 μ L a proliferação foi inibida até 69 %. Em quantidade crescente de rIFN- α 2, a inibição da proliferação celular foi proporcionalmente maior. A partir de 16 U/ 110 μ L de rIFN- α 2, a inibição do crescimento foi mais lenta, mostrando um platô na inibição.

4.9. Avaliação da atividade bloqueadora das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC sobre atividade antiproliferativa do rIFN- α 2

A figura 25 mostra o efeito da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiproliferativa do rIFN- α 2. O controle da 1 U do rIFN- α 2 (0 M) mostrou 66,5 % de crescimento celular, inibindo 33,5 % da proliferação celular. Com a presença da GST-IFNAR2cEC e 1 U do rIFN- α 2 mostrou-se 64-68 % do crescimento celular, não mostrando o bloqueio significativo sobre a atividade do rIFN- α 2, mesmo tendo a concentração bastante elevada (aproximadamente 20.000 vezes mais do que a quantidade de rIFN- α 2). O controle de 2 U de rIFN- α 2 (0 M) mostrou 50 % de crescimento celular, inibindo 50 % da proliferação celular. Com a presença da GST-IFNAR2cEC e 2 U de rIFN- α 2 mostrou-se 48,5–53,5 % do crescimento celular, não mostrando o bloqueio significativo sobre a atividade de rIFN- α 2, mesmo tendo a concentração bastante elevada (aproximadamente 10.000 vezes mais do que a quantidade de rIFN- α 2). O bloqueio da GST-IFNAR2cEC não foi dependente da concentração. Além disso, foi testado o bloqueio da GST-IFNAR2cEC sobre 4 U e 8 U de rIFN- α 2. O resultado foi negativo, não mostrando o bloqueio sobre esta concentração do rIFN- α 2 (Dados não mostrados).

rIFN-α2 (U/100 μL)	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0
Cresc. celular (%*)	31±12	33±11	37±11	40±9	42±10	53±15	75±9	79±1	100

※: % de controle

Figura 24. Efeito de diferentes concentrações de rIFN-α2 sobre a proliferação das células da linhagem Daudi. Células de Daudi (4×10^4 células/100 μL) foram incubadas durante 3 dias com concentração diferente de rIFN-α2. A proliferação das células foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT (595 nm, 650 nm de referência). Os resultados foram expressos por média ± D.P. (n=6)

Concentração da GST-IFNAR2cEC							p ≤ 0,05
	0 M	0,042 nM	0,42 nM	4,2 nM	42 nM	420 nM	
1 U (%*)	66,5 ± 2,5	64 ± 7	65 ± 6	68 ± 8	66 ± 3	64 ± 5	NS
2 U (%*)	50 ± 5	53,5 ± 0,5	52,5 ± 0,5	50,5 ± 1,5	51,5 ± 0,5	48,5 ± 1,5	NS

%; % de controle da célula; NS; Estatisticamente não-significativo.

Figura 25. Efeito da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiproliferativa de rIFN-α2. A GST-IFNAR2cEC foi usada em concentração de 420 nM, 42 nM, 4,2 nM, 0,42 nM, 0,042 nM. O rIFN-α2 foi usada em 2 U (49 pM) e 1 U (24,5 pM). Células de Daudi (4×10^4 células/100 μL) foram incubadas durante 3 dias com concentração diferentes de rIFN-α2 e GST-IFNAR2cEC. A proliferação das células foi avaliada pelo método colorimétrico de MTT (595 nm, 650 nm de referência). Os resultados foram expressos por média ± D.P. (n=6). A GST-IFNAR2cEC não mostrou a atividade bloqueadora estatisticamente significativa sobre a atividade antiproliferativa de rIFN-α2 ($p \leq 0,05$).

4.10. Titulação do vírus EMC por efeito citopático (ECP) nas células Hep 2/c

A titulação do EMCV foi feita para se determinar a melhor diluição de vírus para o teste antiviral. A figura 26 mostra o ECP nas células Hep 2/c causado por vírus EMC diluído em série (1/200, 1/400, 1/800, 1/1.600, 1/3.200, 1/6.400, 1/12.800, 1/25.600, 1/51.200). A diluição 1/200 de vírus causou aproximadamente 92,7 % de ECP e a diluição entre 1/400 e 1/6.400 causou 87-89 % de ECP. Para diluições menores e iguais a 1/12.800, observou-se uma diminuição significativa de ECP (85 % para 1/12.800, 84 % para diluições 1/25.600 e 81 % para 1/51.200). Não foi possível obter 100 % do ECP, mesmo utilizando alta concentração de vírus, o que está de acordo com o cálculo feito para estimar o ECP (Veja o item dos métodos). Assim,

foram escolhidas 3 diluições (1/1.000, 1/2.000 e 1/4.000) para teste de sensibilidade das células de linhagem Hep 2/c ao rIFN- α 2, na faixa entre 1/400 e 1/6.400, na qual observa-se um ECP praticamente constante.

Figura 26. Titulação do vírus EMC por efeito citopático (ECP) nas células Hep 2/c. Células Hep2/c (3×10^4 células/ 100 μ L) foram incubadas durante 1 dia e infectadas com o EMCV de diluição seriada por 25~26 h. O efeito citopático foi avaliado pela coloração com negro de amido (absorbância de 620 nm). Os dados foram expressos em média $\pm$ D.P. (n=9).

4.11. Teste de sensibilidade das células de linhagem Hep 2/c à atividade antiviral de rIFN- α 2

Quantidades inferiores a 16 U de IFN não afetaram o crescimento das células da linhagem Hep 2/c (O crescimento foi de 97~108 %), ou seja, o IFN não foi tóxico às células Hep 2/c nestas quantidades (dados não mostrados).

A figura 27 mostra o perfil do efeito citopático do vírus EMC nas células Hep 2/c na presença de diferentes concentrações de rIFN- α 2. O controle de vírus (sem IFN) mostrou 81,8~87,1 % de efeito citopático sobre as células Hep 2/c. O IFN inibiu a atividade viral (efeito citopático) em quantidade crescente. Com 16 U de IFN, foi observado o efeito citopático 33,2 %, 21,7 % e 20,3 % nas diluições 1/1.000, 1/2.000 e 1/4.000 respectivamente. Com o vírus na diluição 1/1.000 e na presença de 1 U de IFN, foi observado o efeito citopático de 62,7 %, ou seja, o IFN inibiu 24,4 % do efeito citopático quando comparado ao controle de vírus (sem IFN). Com o vírus nas diluições 1/2.000 e 1/4.000, 1 U de IFN inibiu 29,7 % e 44,5 % do ECP respectivamente em comparação ao controle de vírus (sem IFN). Foi

observada uma inibição de 55 % de ECP com 8 U, 4 U e 2 U de IFN nas diluições de vírus 1/1.000, 1/2.000 e 1/4.000 respectivamente. Quanto maior a diluição de vírus, menos quantidade de IFN foi necessária para a mesma porcentagem de inibição da atividade viral. O IFN mostrou alta inibição de efeito citopático do vírus EMC sobre as células Hep 2/c.

4.12. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC sobre atividade antiviral do rIFN- α 2

Utilizando como referência os resultados obtidos no teste de sensibilidade das células da linhagem Hep 2/c à atividade antiviral do rIFN- α 2, foi utilizada a diluição de vírus 1/2.000, na qual foi observado o ECP de 54 % com 1 U de IFN. Utilizaram-se também 8 U, 4 U e 2 U de IFN para avaliar a atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC.

A figura 28 mostra os resultados da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiviral do rIFN- α 2. O controle do IFN mostrou 25 %, 12,5 %, 9,1 % e 2,8 % de ECP com 1 U, 2 U, 4 U e 8 U de IFN respectivamente. O controle do vírus (sem IFN e sem GST-IFNAR2cEC) mostrou 82 % de ECP (Dado não mostrado). O controle da GST-IFNAR2cEC (sem IFN) mostrou 82 %, 87 % e 81 % de ECP nas concentrações 4,2 nM, 42 nM e 420 nM respectivamente, não tendo interferência alguma no ECP do vírus (Dados não mostrados). Não foi observado o bloqueio da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiviral de 1 U do IFN em todas as suas concentrações. Na presença de 2 U de IFN, 0,42 nM e 420 nM de GST-IFNAR2cEC aumentaram 4,7 % e 3,6 % do ECP, bloqueando a atividade antiviral do IFN. Na presença de 4 U do IFN, 0,042 nM e 0,42 nM de GST-IFNAR2cEC aumentaram 11,4 % e 2,6 % do ECP, bloqueando a atividade antiviral do IFN. Na presença de 8 U de IFN, 42 nM de GST-IFNAR2cEC aumentaram 2,4 % do ECP, bloqueando a atividade antiviral do IFN. Porém, esses bloqueios não foram em quantidade crescentes e não foram estatisticamente significativos conforme o teste de Spearman. Também, a atividade antiviral de 1 U de IFN não foi bloqueada pela GST-IFNAR2cEC.

Diluição do vírus	rIFN-α2 (Unidades/ 100μL)							
	0	0,25	0,5	1	2	4	8	16
1/1000 (%*)	87,1	76,0	71,3	62,7	51,4	43,2	32,1	33,2
1/2000 (%*)	83,8	69,4	64,4	54,1	45,4	27,7	20,6	21,7
1/4000 (%*)	81,8	61,9	48,6	37,3	25,5	16,4	14,3	20,3

%%: % do ECP

Figura 27. Efeito citopático do vírus EMC nas células da linhagem Hep2/c na presença de diferentes concentrações do rIFN-α2. Células Hep2/c (3×10^4 células/ 100 μL) foram incubadas durante 1 dia com concentração diferente do rIFN-α2 e infectadas com EMCV por 25 ~26 horas. O efeito citopático foi avaliado pela coloração com negro de amido (absorbância de 620 nm).

	Concentração da GST-IFNAR2cEC						p ≤ 0,05
	0 M	0,042 nM	0,42 nM	4,2 nM	42 nM	420 nM	
1 U (%*)	25,1±1,3	19,9±0	24±0	14,8±4,9	15,2±0,9	19,8±1,5	NS
2 U (%*)	12,5±2,4	8,5±0,3	17,2±6,9	13,2±6,3	5,2±4,9	16,1±6,4	NS
4 U (%*)	9,1±1,1	20,5±1,5	11,7±1,9	6,7±5,5	3,2±8,0	5,1±3,0	NS
8 U (%*)	2,8±3,6	3,6±6,2	-2,8±2,3	-1,4±3,0	5,2±4,2	3,2±3,5	NS

%; % de ECP; NS; Estatisticamente não-significativo.

Figura 28. Efeito da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiviral do rIFN- α 2. Células Hep 2/c (3×10^4 células/ 100 μ L) com rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC foram incubadas durante 1 dia e depois infectadas com o vírus de EMC por 25~26 h. O efeito citopático foi avaliado pela coloração com negro de amido (absorvância de 620 nm). Os resultados foram expressos por média $\pm$ D.P. (n=2). A GST-IFNAR2cEC não mostrou a atividade bloqueadora estatisticamente significativa sobre a atividade antiviral de rIFN- α 2 ($p \leq 0,05$).

4.13. Estudo da expressão gênica do STAT 1 e da 2',5'-OAS pela RT-PCR nas células Daudi e Hep 2/c estimuladas com rIFN- α 2

4.13.1. Otimização da RT-PCR

As condições avaliadas foram: quantidade de RNA necessária para a síntese do cDNA, número de ciclos de amplificação da PCR e temperatura de hibridação durante os ciclos da amplificação da PCR.

4.13.1.1. Extração de RNA total

Para extração de RNA foram usadas 5×10^5 células Hep 2/c e 1×10^6 células Daudi. A quantidade de RNA total extraído variou de 7,6 a 17 μ g. A pureza observada pela relação de absorvâncias em 260nm e 280nm foi entre 1,7 e 1,9.

4.13.1.2. Quantidade de RNA

Foram utilizadas 0,4 µg de RNA total para a síntese do cDNA para duas linhagens de células. Essa concentração foi utilizada por questão de conveniência, pois o kit SuperscriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR requer que sejam usados 8 µL de RNA diluído e a concentração obtida após a extração do RNA foi 0,4 µg/8 µL. Como foi obtido um bom resultado da síntese do cDNA do gene de interesse com essa concentração, utilizou-se assim para todos os experimentos de expressão gênica.

4.13.1.3. Avaliação da temperatura de hibridação para PCR

Para os ensaios de amplificação pela PCR, uma das temperaturas mais importantes é a da hibridação, pois uma temperatura adequada da hibridação determina a especificidade de ligação dos iniciadores da sequência do gene a ser amplificada.

As temperaturas de hibridação para amplificação do STAT 1 foram 52 °C e 55 °C. A amplificação do STAT 1 foi adequada nas duas temperaturas (dados não mostrados). No entanto, foi escolhida a temperatura de 55 °C, pois uma maior temperatura aumenta a especificidade de ligação dos iniciadores. Além desse motivo, optou-se pela temperatura de 55 °C por ser essa a temperatura recomendada para amplificação do gene GAPDH (controle, gene constitutivo), com o objetivo de evitar ao máximo as variações intra-ensaio.

A temperatura de hibridação para amplificação da 2', 5'-OAS utilizada foi de 53 °C e 55 °C. A amplificação da 2', 5'-OAS foi adequada nessas temperaturas (dado não mostrado).

4.13.1.4. Número de ciclos

A determinação do número de ciclos da PCR é um parâmetro importante a ser definido, uma vez que essa reação se desenvolve de maneira exponencial até atingir um ponto de saturação, o qual não deve ser utilizado nos estudos de expressão gênica (Huang *et al.*, 1996). Para a amplificação do gene STAT1 foram realizados testes com 25~40 ciclos. Na figura 29A, observam-se que a expressão gênica do STAT1 pode ser

fracamente detectada com 25 ciclos, e aumentam de acordo com o número de ciclos (30, 35, 40 ciclos). Baseando-se nesses resultados, utilizou-se inicialmente 30 ciclos para estudo da expressão gênica do STAT 1 nas células Daudi tratadas com rIFN- α 2.

Para amplificação do gene STAT 1 a partir das células Hep 2/c foram realizados testes com 25 a 40 ciclos de amplificação pela PCR. Na figura 29B, observam-se que a expressão gênica do STAT 1 foi detectada de forma discreta com 25 ciclos de amplificação, portanto foram aumentados de acordo com o número de ciclos de amplificação (27, 30, 35 e 40 ciclos de amplificação). Com base nesses resultados, utilizou-se inicialmente 25 ciclos de amplificação para estudo da expressão gênica do STAT 1 utilizando as células Hep 2/c tratadas com rIFN- α 2.

Figura 29. Fotografia do gel de agarose a 1,5 % dos produtos da RT-PCR do gene STAT 1 obtidos a partir de 25, 27, 30, 35 e 40 ciclos de amplificação, cujo cDNA foi obtido pela RT de 0,4 μ g de RNA das células Daudi e Hep 2/c sem rIFN- α 2. Coluna M, Marcador de pares de base de DNA (100 bp). Colunas 25, 27, 30, 35 e 40, produtos de PCR obtidos com 25, 27, 30, 35 e 40 ciclos de amplificação; Coluna C, controle de reagentes.

Para amplificação do gene da 2', 5'-OAS obtidas a partir das culturas de células Daudi e Hep 2/c foram realizados testes com 25 a 40 ciclos de amplificação (figura 30). A partir das células Daudi, os produtos da 2', 5'-OAS houve detecção discreta com 25 ciclos de amplificação, e aumentam de acordo com o número de ciclos de amplificação. Porém, a partir das células Hep 2/c os produtos da 2', 5'-OAS foram detectados de maneira discreta somente com 30 ciclos e aumentaram de acordo com o número de ciclos de amplificação.

Na figura 31, observa-se fotografia do gel de agarose com os produtos de amplificação do gene GAPDH. Com apenas 20 ciclos de amplificação foi possível ser detectados os produtos da GAPDH e com 25 ciclos de amplificação observa-se uma banda de alta intensidade mostrando abundante expressão gênica nessas células.

Figura 30. Fotografia do gel de agarose a 1,5 % dos produtos da RT-PCR do gene 2', 5'-OAS obtidos a partir de 25, 27, 30, 35 e 40 ciclos de amplificação, cujo cDNA foi obtido pela RT de 0,4 µg de RNA das células Daudi e Hep 2/c sem rIFN-α2. Coluna M, Marcador de pares de base de DNA (100bp). Colunas 25, 27, 30, 35 e 40, produtos de PCR obtidos com 25, 27, 30, 35 e 40 ciclos de amplificação.

Figura 31. Fotografia do gel de agarose a 1,5 % dos produtos da RT-PCR do gene GAPDH obtidos a partir de 20, 22, 25 e 27 ciclos de amplificação, cujo cDNA foi obtido pela RT de 0,4 µg de RNA das células Hep 2/c sem rIFN-α2. Coluna M, Marcador de pares de base de DNA (100bp). Colunas 20, 22, 25 e 27, produtos de PCR obtidos com 20, 22, 25 e 27 ciclos de amplificação; Coluna C, controle de reagentes.

4.13.2. Expressão gênica do STAT 1 utilizando as células Hep 2/c e Daudi pela RT-PCR duplex

4.13.2.1. Expressão gênica do STAT 1 utilizando as células Hep 2/c pela RT-PCR duplex

A figura 32 mostra a fotografia do gel dos produtos da PCR-duplex dos genes do STAT 1 e da GAPDH. Observa-se que com 25 ciclos de amplificação pela PCR a intensidade do fragmento correspondente ao gene da GAPDH apresentou maior que a do STAT 1. Quando a expressão do gene do STAT 1 foi amplificada pela PCR isoladamente, mostraram-se melhores resultados quando efetuadas com as células Hep 2/c tratadas com IFN (dado não mostrado). Isto mostra que a quantidade do mRNA da GAPDH é muito maior que o mRNA do STAT 1 a ponto de, na PCR-duplex, a amplificação da GAPDH prevalecer na competição com a amplificação do STAT 1. Como foi observada na figura 31, a amplificação da GAPDH é adequada com 25 ciclos de amplificação, quase atingindo um ponto de saturação quando se usam as células Hep 2/c sem IFN. Porém, a amplificação do STAT 1 com 25 e 27 ciclos de amplificação não é adequada, como pode ser observado na figura 32A. Com 29 ciclos de amplificação pela PCR, a expressão gênica do STAT 1 é invisível no gel de agarose, como pode ser observado na figura 32C, mostrando que a alta quantidade dos produtos amplificados do gene GAPDH com 25 ciclos de amplificação domina reação de amplificação competitiva na PCR-duplex para números ciclos de amplificação maiores.

Figura 32. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos da PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH nas células Hep 2/c. O cDNA foi obtido pela RT, utilizando 0,4 μ g de RNA total a partir das células Hep 2/c tratadas com 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 U de rIFN- α 2 por 4 h. O número de ciclos de amplificação está indicado acima de cada foto. Colunas 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000, produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 (387 bp) e do GAPDH (452 bp) das células Hep 2/c tratadas com respectiva unidade de rIFN- α 2; Coluna C, controle de reagentes.

A partir dos resultados acima, modificou-se as condições experimentais para amplificação do gene GAPDH na PCR-duplex, diminuindo a concentração dos iniciadores da GAPDH para que os dois genes de STAT 1 e GAPDH amplificassem de modo semelhante no mesmo número de ciclos de amplificação.

A figura 33 mostra a fotografia do gel dos produtos de PCR-duplex dos genes de STAT 1 e GAPDH. A amplificação do gene GAPDH diminuiu significativamente quando comparada à da figura 32B e, por outro lado, a amplificação do gene STAT 1 aumentou de modo que a intensidade do fragmento de 0 U foi semelhante ao da GAPDH de 0 U. Essa semelhança mostra que o uso da concentração de 100 nM dos iniciadores da GAPDH (50 % da concentração dos iniciadores do STAT 1) foi adequado para PCR-

duplex quando usam-se as células Hep 2/c, fazendo com que os dois genes fossem amplificados de forma competitiva mais adequadas para avaliação. Observa-se que a expressão gênica do STAT 1 aumenta significativamente com 20 U do IFN- α 2. Por outro lado, a expressão gênica da GAPDH foi constante com aumento do IFN, mostrando-se adequado como controle interno.

Figura 33. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH com iniciadores do STAT 1 a 200 nM e iniciadores da GAPDH a 100 nM das células Hep 2/c. O cDNA foi obtido pela RT, utilizando 0,4 μ g de RNA total a partir das células Hep 2/c tratadas com 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 U de rIFN- α 2 por 4 h. Colunas 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000, produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 (387 bp) e do GAPDH (452 bp) das células Hep 2/c tratadas com respectiva unidade de rIFN- α 2; Coluna C, controle de reagentes.

4.13.2.2. Expressão gênica do STAT 1 utilizando as células Daudi pela RT-PCR duplex

A figura 34 mostra a fotografia do gel dos produtos da PCR-duplex dos genes de STAT 1 e GAPDH com as células Daudi usando-se concentrações diferentes de iniciadores entre STAT 1 (200 nM) e GAPDH (100 nM). Observa-se que com 28 e 29 ciclos de amplificação pela PCR, a expressão gênica do STAT 1 aumentou significativamente com aumento do IFN (de 1 U a 10 U) e permanece constante até 1000 U. Por outro lado, a expressão do mRNA da GAPDH foi constante com aumento do IFN. Porém, como pode ser observado pela intensidade dos fragmentos amplificados correspondentes às células sem IFN (0 U), a expressão do gene GAPDH foi maior do que a do STAT 1, mesmo com iniciadores a 100 nM. Quando foram usadas 50 nM de iniciadores para GAPDH (Figura 35) na PCR-duplex, a amplificação do gene da GAPDH diminuiu significativamente quando comparada à da figura 34B. Esses resultados mostram que o uso de 100 nM dos iniciadores para GAPDH (50 % da concentração dos iniciadores para

STAT 1) e 28 ciclos de amplificação foram condições adequadas para PCR-duplex quando se utilizou as células Daudi.

Figura 34. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH com iniciadores do STAT 1 a 200 nM e iniciadores da GAPDH a 100 nM das células Daudi. O cDNA foi obtido pela RT, utilizando 0,4 μ g de RNA total a partir das células Daudi tratadas com 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 U de rIFN- α 2 por 4 h. O número de ciclos de amplificação está indicado acima de foto. Colunas 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000, produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 (387 bp) e do GAPDH (452 bp) das células Daudi tratadas com respectiva unidade de rIFN- α 2; Coluna C, controle de reagentes.

Figura 35. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH com iniciadores do STAT 1 a 200 nM e iniciadores da GAPDH a 50 nM das células Daudi. O cDNA foi obtido pela RT, utilizando 0,4 μ g de RNA total a partir das células Daudi tratadas com 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 U de rIFN- α 2 por 4 h. Lnas 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000, produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 (387 bp) e do GAPDH (452 bp) das células Daudi tratadas com respectiva unidade de rIFN- α 2; Coluna C, controle de reagentes.

4.13.3. Expressão gênica da 2', 5'-OAS utilizando as células Hep 2/c e Daudi pela RT-PCR duplex

4.13.3.1. Expressão gênica da 2', 5'-OAS utilizando as células Hep 2/c pela RT-PCR duplex

Na figura 36A, observa-se que o fragmento da GAPDH apresentou maior intensidade quando foi utilizada a mesma concentração dos iniciadores (200 nM) tanto para a 2', 5'-OAS quanto para a GAPDH.

Portanto, foi realizada a PCR-duplex, diminuindo-se a concentração dos iniciadores da GAPDH para 100 nM. Como pode ser observado na figura 36B, a amplificação do mRNA do gene 2', 5'-OAS melhorou de forma significativa e a do gene GAPDH se adequou às condições do ensaio quando foi comparada com a da figura 36A. Com o uso de iniciadores da GAPDH a 50 nM, a amplificação do mRNA do gene GAPDH não foi adequada em relação à da 2', 5'-OAS (Figura 36C). Verificou-se que o uso da concentração de 100 nM dos iniciadores da GAPDH foi adequado para amplificação conjunta (PCR-duplex) da 2', 5'-OAS e da GAPDH.

Porém, observa-se que com o uso da concentração de 100 nM dos iniciadores para GAPDH, ocorre um fragmento inespecífica de tamanho aproximadamente 720 a 740 bp (Figura 36B).

Figura 36. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS e GAPDH com 32 ciclos de amplificação e a temperatura de hibridação 53 ° C das células Hep 2/c. O cDNA foi obtido pela RT, utilizando 0,4 µg de RNA total a partir das células Hep 2/c tratadas com 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 U de rIFN-2 por 4 h. Na PCR foram utilizados 32 ciclos de amplificação de 94 °C por 1 min. (desnaturação), 53 °C por 1 min. (hibridação) e de 72 °C por 1 min. A concentração utilizada dos iniciadores da GAPDH foi 200 nM (A), 100 nM (B) e 50 nM (C). Colunas 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000, produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS (205 bp) e do GAPDH (452 bp) das células Hep 2/c tratadas com respectiva unidade de rIFN-α2; Coluna C, controle de reagentes.

Então, para evitar essas bandas inespecíficas na PCR-duplex, foi aumentada a temperatura de hibridação de 53 °C para 55 °C, a fim de se aumentar a especificidade de hibridação dos iniciadores. A figura 37 mostra a fotografia do gel dos produtos da amplificação conjunta da 2', 5'-OAS e da GAPDH pela PCR, utilizando-se temperatura de hibridação de 55 °C. Como pode ser observado, com aumento da temperatura, desaparece a banda inespecífica de tamanho 720 a 740 bp. Observou-se que o uso de 32 ciclos de amplificação, iniciadores da GAPDH a 100 nM, iniciadores da 2', 5'-OAS a 200 nM e temperatura de hibridação de 55 °C foram condições ideais para avaliar a expressão do mRNA da 2', 5'-OAS nas células Hep 2/c.

**32 ciclos de amplificação, iniciadores da GAPDH a 100 nM,
temperatura de hibridação 55 ° C**

Figura 37. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS e GAPDH com 32 ciclos de amplificação e a temperatura de hibridação 55 ° C nas células Hep 2/c. O cDNA foi obtido pela RT, utilizando 0,4 µg de RNA total a partir das células Hep 2/c tratadas com 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 U de rIFN-2 por 4 h. Na PCR foram utilizados 32 ciclos de amplificação de 94 oC por 1 min. (desnaturação), 55 oC por 1 min. (hibridação) e de 72 oC por 1 min. A concentração utilizada dos iniciadores da GAPDH foi 100 nM. Colunas 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000, produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS (205 bp) e do GAPDH (452 bp) das células Hep 2/c tratadas com respectiva unidade de rIFN-α2; Coluna C, controle de reagentes.

Na figura 37 observa-se que a expressão do mRNA da 2', 5'-OAS aumenta proporcionalmente com aumento do IFN. O resultado foi semelhante ao resultado obtido com a RT-PCR do gene 2', 5'-OAS quando esse gene foi amplificado de forma isolada (dados não mostrados).

4.13.3.2. Expressão gênica da 2', 5'-OAS, utilizando as células Daudi por RT-PCR duplex

A figura 38 mostra a fotografia do gel dos produtos obtidos através da RT-PCR duplex dos genes de 2', 5'-OAS e GAPDH. Observa-se que com o aumento de número de ciclos de amplificação, a intensidade do fragmento da GAPDH aumenta em todas as concentrações de IFN. Porém, a expressão gênica da 2', 5'-OAS não mostrou aumento significativo com concentrações de IFN em 10 a 1.000 U, mesmo com o aumento de número de ciclos de amplificação (27 e 28 ciclos de amplificação), indicando um ponto de saturação na PCR, os quais não devem ser utilizados nos estudos de expressão gênica. Com 25 ciclos de amplificação, observou-se que a diferença da expressão gênica da 2', 5'-OAS entre as concentrações diferentes de IFN foi discreta. Verificou-se que 26 ciclos de amplificação foram necessários para medida semi-quantitativa da expressão gênica da 2', 5'-OAS. Observou-se que a expressão do mRNA da 2', 5'-OAS foi crescente com o aumento do IFN nas células Daudi. Por outro lado, a expressão

gênica da GAPDH foi constante em concentrações diferentes de IFN, mostrando adequado para controle interno.

Figura 38. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS (200 nM de iniciadores) e GAPDH (100 nM de iniciadores) utilizando a temperatura de hibridação 55 ° C das células Daudi. O número de ciclos de amplificação está indicado acima de cada foto. Na PCR foi utilizado 55 °C como temperatura da hibridação. O cDNA foi obtido pela RT, utilizando 0,4 µg de RNA total a partir das células Daudi tratadas com 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000 U de rIFN- α 2 por 4 h. Colunas 0, 0,1 1, 10, 20, 40, 100, 200, 400 e 1000, produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS (205 bp) e do GAPDH (452 bp) das células Daudi tratadas com respectiva unidade de rIFN- α 2; Coluna C, controle de reagentes.

A tabela 6 mostra condições utilizadas na otimização da RT-PCR dos genes 2', 5'-OAS e STAT 1 e da expressão gênica dos dois genes nas células Daudi e Hep 2/c estimuladas com rIFN- α 2 com base em análise visual dos géis de agarose. Como pode ser observado, nas células Daudi a expressão dos genes 2', 5'-OAS e STAT 1 aumenta significativamente com estímulo de 1 a 10 U de rIFN- α 2, na PCR-duplex. Por outro lado, nas células

Hep 2/c, a expressão da 2', 5'-OAS aumentou significativamente com estímulo de 10 a 20 U de rIFN- α 2 e a expressão gênica do STAT 1, com estímulo de 20 U.

4.13.4. Medida semi-quantitativa da expressão do mRNA do STAT 1 e da 2', 5'-OAS

Na figura 39, apresenta a análise gráfica da correlação entre as quantidades de mRNA da 2', 5'-OAS e STAT 1 e a concentração de rIFN- α 2 nas células Daudi e Hep 2/c. Observou-se que as medidas semi-quantitativas confirmam os resultados obtidos a partir do análise visual dos géis de agarose dos produtos amplificados por PCR-duplex (Tabela 6). A expressão dos genes 2', 5'-OAS e STAT 1 nas células Daudi aumentam significativamente com estímulo de 1 a 10 U do rIFN- α 2. Por outro lado, a expressão da 2', 5'-OAS e STAT 1 nas células Hep 2/c aumenta significativamente com estímulo de 10 a 20 U do rIFN- α 2. A partir de 100 U de rIFN- α 2, a expressão dos dois genes permanece praticamente constante nas células Daudi e Hep 2/c.

Quando foram comparados os níveis de expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS na presença de diferentes concentrações de IFN- α nas células Daudi e Hep 2/c, os comportamentos da expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS para cada tipo de célula foram proporcionais.

Tabela 6. Condições utilizadas na otimização da RT-PCR dos genes 2', 5'-OAS e STAT 1 e da expressão gênica do mRNA dos genes 2', 5'-OAS e STAT 1 nas células Daudi e Hep 2/c estimuladas com rIFN- α 2

Gene	<i>Células Daudi</i> (1 x 10 ⁶ células/ mL)		<i>Células Hep 2/c</i> (5 x 10 ⁵ células/ mL)	
	2', 5'-OAS	STAT 1	2', 5'-OAS	STAT 1
bp de produto amplificado na PCR	205 bp	387 bp	205 bp	387 bp
Concentração de iniciadores dos genes 2',5',-OAS e STAT 1	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM
Concentração de iniciadores da GAPDH na PCR-duplex	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM
Temperaturas utilizadas na PCR-duplex (Desnaturação /Hibridação /Extensão)	94 ° C / 55 ° C/ 72 ° C	94 ° C / 55 ° C/ 72 ° C	94 ° C / 55 ° C/ 72 ° C	94 ° C / 55 ° C/ 72 ° C
Nº de ciclos de amplificação na PCR-duplex	26	28	32	27
Expressão gênica significativa dos genes 2',5'-OAS e STAT 1 na PCR simples (U de rIFN- α 2)	1 a 10 U	1 a 10 U	10 a 20 U	20 U
Expressão gênica significativa dos genes 2',5'-OAS e STAT 1 na PCR-duplex (U de rIFN- α 2)	1 a 10 U	1 a 10 U	10 a 20 U	20 U

Figura 39. Comparação dos níveis de expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS na presença de diferentes concentrações de IFN- α . Os comportamentos da expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS foram proporcionais para diferentes concentrações de IFN- α .

4.14. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão gênica dos 2', 5'-OAS e STAT 1, utilizando células da linhagem Daudi e Hep 2/c.

4.14.1. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão dos genes da 2', 5'-OAS e do STAT 1 nas células Daudi

Quando se compara a expressão gênica da 2', 5'-OAS pela intensidade dos fragmentos amplificados entre as células de controle de rIFN- α 2 e as células tratadas com rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC, observa-se que a expressão gênica da 2', 5'-OAS diminuiu com a adição da GST-IFNAR2cEC a 420 nM e a 42 nM (Figura 40B) (Tabela 7). Por outro lado, quando a GST foi adicionada nas células em vez da GST-IFNAR2cEC, a expressão gênica da 2', 5'-OAS não diminuiu em relação ao controle de rIFN- α 2. Isso sugere que somente a GST-IFNAR2cEC foi capaz de inibir a expressão gênica da 2', 5'-OAS induzida pela ação de rIFN- α 2. Com o uso de 1 U de rIFN- α 2 (Figura 40A), não foi possível observar diferenças na expressão gênica da 2', 5'-OAS devido à baixa expressão observada pela intensidade dos fragmentos amplificados em todas as amostras.

A figura 41 mostra a fotografia do gel dos produtos de RT-PCR duplex dos genes do STAT 1 e da GAPDH, utilizando-se as células Daudi tratadas com IFN e GST-IFNAR 2cEC. Como pode ser observado na figura 41 B entre o controle de rIFN- α 2 (1 e 10 U) e as células tratadas com rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC, a GST-IFNAR2cEC não inibiu a expressão gênica do STAT 1 induzida por 10 U do rIFN- α 2.

Observa-se nas tabelas 7 e 8 que as medidas semi-quantitativas confirmam os resultados obtidos a partir do análise visual dos géis de agarose dos produtos amplificados por PCR-duplex.

Figura 40. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS e GAPDH, utilizando células Daudi. A GST-IFNAR2cEC foi usada nas concentrações de 420 nM, 42 nM, 4,2 nM, 0,42 nM. O rIFN- α 2 foi usado em 1 U (A) e 10 U (B). As células Daudi foram incubadas por 4 h com concentrações diferentes de rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC. Após esse período, as células foram submetidas à extração de RNA total e, em seguida, à reação de transcrição reversa (RT). A expressão gênica da 2', 5'-OAS nas células Daudi foi avaliada pela PCR duplex. O gene da GAPDH foi usado como gene constitutivo. Coluna cC, controle de célula (células sem IFN e sem GST-IFNAR2cEC); Coluna cl, controle do IFN (células com IFN); Coluna cR, controle do receptor (células com GST-IFNAR2cEC); Colunas 420, 42, 4,2 e 0,42, células com IFN e com GST-IFNAR2cEC a 420 nM, 42 nM, 4,2 nM e 0,42 nM respectivamente; cG, controle da GST (células com GST); G, célula com IFN e GST a 6.990 nM.

Tabela 7. Valores relativos de expressão gênica da 2',5'-OAS obtidas pela relação 2',5'-OAS/GAPDH. A medida da expressão gênica da 2',5'-OAS foi obtida em valores relativos entre a densidade óptica do produto de amplificação da 2',5'-OAS e a densidade óptica do produto de amplificação da GAPDH utilizando a fotografia do gel de agarose da figura 40.

	cC	cl	cR	420	42	4,2	0,42	cG	G
(A) 1 U	1,032	1,168	1,044	1,058	1,112	1,105	1,205	0,977	1,043
(B) 10 U	0,682	1,323	0,695	1,035	1,145	1,419	-	-	1,532

Figura 41. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes STAT 1 e GAPDH, utilizando células Daudi. A GST-IFNAR2cEC foi usada nas concentrações de 420 nM, 42 nM, 4,2 nM, 0,42 nM. O rIFN- α 2 foi usado em 1 U (A) e 10 U (B). As células Daudi foram incubadas por 4 h com concentrações diferentes de rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC. Após esse período, as células foram submetidas à extração de RNA total e, em seguida, à reação de transcrição reversa (RT). A expressão gênica do STAT 1 nas células Daudi foi avaliada pela PCR duplex. O gene da GAPDH foi usado como gene constitutivo. Coluna cC, controle de célula (células sem IFN e sem GST-IFNAR2cEC); Coluna cl, controle do IFN (células com IFN); Coluna cR, controle do receptor (células com GST-IFNAR2cEC); Colunas 420, 42, 4,2 e 0,42, células com IFN e com GST-IFNAR2cEC a 420 nM, 42 nM, 4,2 nM e 0,42 nM respectivamente; cG, controle da GST (células com GST); G, célula com IFN e GST a 6.990 nM.

Tabela 8. Valores relativos de expressão gênica do STAT 1 obtidas pela relação STAT 1/GAPDH. A medida da expressão gênica do STAT 1 foi obtida em valores relativos entre a densidade óptica do produto de amplificação do STAT 1 e a densidade óptica do produto de amplificação da GAPDH utilizando a fotografia do gel de agarose da figura 41.

	cC	cl	cR	420	42	4,2	0,42	cG	G
(A) 1 U	0,909	1,081	0,890	1,039	1,008	0,950	1,073	0,904	0,951
(B) 10 U	0,632	0,979	0,705	0,909	1,030	0,956	-	-	1,335

4.14.2. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão gênica da 2', 5'-OAS e do STAT 1 nas células Hep 2/c

Na figura 42B observa-se que a expressão gênica da 2', 5'-OAS entre as células de controle de rIFN- α 2 e as células tratadas com rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC foi inibida com a adição da GST-IFNAR2cEC a 420 nM e a 42 nM (Tabela 9). Quando foi usado rIFN- α 2 a 20 U, observou-se a inibição

da expressão gênica da 2', 5'-OAS pela GST-IFNAR2cEC foi mais nítida do que quando foi usado o rIFN- α 2 a 10 U. Porém, essa inibição ocorreu também quando a GST foi adicionada às células em vez da GST-IFNAR2cEC. Interessantemente, a GST não inibiu a expressão gênica da 2', 5'-OAS das células Daudi, e sim somente nas células Hep 2/c.

Como pode ser observado na figura 43 comparando-se a intensidade dos fragmentos amplificados entre controle de rIFN- α 2 (10 e 20 U) e as células tratadas com o rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC, a GST-IFNAR2cEC não inibiu a expressão gênica do STAT 1.

Observa-se nas tabelas 9 e 10 que as medidas semi-quantitativas confirmam os resultados obtidos a partir do análise visual dos géis de agarose dos produtos amplificados por PCR-duplex.

Figura 42. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes 2', 5'-OAS e GAPDH, utilizando células Hep 2/c. A GST-IFNAR2cEC foi usada nas concentrações de 420 nM, 42 nM, 4,2 nM, 0,42 nM. O rIFN- α 2 foi usado em 10 U (A) e 20 U (B). As células Hep 2/c foram incubadas por 4 h com concentrações diferentes de rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC. Após esse período, as células foram submetidas à extração de RNA total e, em seguida, à reação de transcrição reversa (RT). A expressão gênica da 2', 5'-OAS nas células Hep 2/c foi avaliada pela PCR duplex. O gene da GAPDH foi usado como gene constitutivo. Coluna cC, controle de célula (células sem IFN e sem GST-IFNAR2cEC); Coluna cl, controle do IFN (células com IFN); Coluna cR, controle do receptor (células com GST-IFNAR2cEC); Colunas 420, 42, 4,2 e 0,42, células com IFN e com GST-IFNAR2cEC a 420 nM, 42 nM, 4,2 nM e 0,42 nM respectivamente; cG, controle da GST (células com GST); G, célula com IFN e GST a 6990 nM.

Tabela 9. Valores relativos de expressão gênica da 2', 5'-OAS obtidas pela relação 2',5'-OAS /GAPDH. A medida da expressão do mRNA d2', 5'-OAS foi obtida em valores relativos entre a densidade óptica do produto de amplificação da 2', 5'-OAS e a densidade óptica do produto de amplificação da GAPDH utilizando a fotografia do gel de agarose da figura 42.

	cC	cl	cR	420	42	4,2	0,42	cG	G
(A) 10 U	0,59	0,975	0,593	0,807	0,814	0,964	-	-	0,592
(B) 20 U	0,5	0,946	0,561	0,698	0,79	0,926	0,884	0,571	0,774

Figura 43. Fotografia do gel de agarose a 2 % dos produtos de PCR-duplex dos genes **STAT 1** e **GAPDH**, utilizando células **Hep 2/c**. A GST-IFNAR2cEC foi usada nas concentrações de 420 nM, 42 nM, 4,2 nM, 0,42 nM. O rIFN- α 2 foi usado em 10 U (A) e 20 U (B). As células Hep 2/c foram incubadas por 4 h com concentrações diferentes de rIFN- α 2 e GST-IFNAR2cEC. Após esse período, as células foram submetidas à extração de RNA total e, em seguida, à reação de transcrição reversa (RT). A expressão gênica do STAT 1 nas células Hep 2/c foi avaliada pela PCR duplex. O gene da GAPDH foi usado como gene constitutivo. Coluna cC, controle de célula (células sem IFN e sem GST-IFNAR2cEC); Coluna cl, controle do IFN (células com IFN); Coluna cR, controle do receptor (células com GST-IFNAR2cEC); Colunas 420, 42, 4,2 e 0,42, células com IFN e com GST-IFNAR2cEC a 420 nM, 42 nM, 4,2 nM e 0,42 nM respectivamente; cG, controle da GST (células com GST); G, célula com IFN e GST a 6990 nM.

Tabela 10. Valores relativos de expressão gênica do STAT 1 obtidas pela relação STAT 1/GAPDH. A medida da expressão do mRNA do STAT 1 foi obtida em valores relativos entre a densidade óptica do produto de amplificação do STAT 1 e a densidade óptica do produto de amplificação da GAPDH utilizando a fotografia do gel de agarose da figura 43.

	cC	cl	cR	420	42	4,2	0,42	cG	G
(A) 10 U	0,679	0,933	0,624	0,866	0,794	0,872	-	-	1,218
(B) 20 U	1,310	1,362	1,273	1,384	1,4	1,339	1,305	1,287	1,417

5. DISCUSSÃO

Devido à produção anormal do IFN- α em certas doenças autoimunes e do aparecimento dessas doenças nos pacientes tratados com IFN- α , tem-se sugerido que o IFN- α faz um papel proeminente na iniciação e manutenção do desenvolvimento das doenças autoimunes. Considerando esse aspecto, o presente trabalho procurou obter um inibidor da ação do IFN- α , através da produção da proteína recombinante do domínio extracelular da subunidade 2c do IFNAR. Esse inibidor pode ser útil para investigação da patogênese dessas doenças e para esclarecer o mecanismo da ação do IFN- α ainda pouco conhecido.

5.1. Subclonagem do fragmento de DNA do domínio extracelular da IFNAR 2c nos vetores de expressão pRSET A e pGEX 4T-2

O fragmento de DNA que codifica para o domínio extracelular da IFNAR 2c (747 bp) foi produzido pela PCR. Esse fragmento foi inserido com sucesso nos vetores de expressão pRSET A e pGEX 4T-2. Como foi observado na tabela 4, dentre as colônias transformadas, só algumas tiveram plasmídeos com inserto, mesmo que a subclonagem tenha sido sítio-dirigido.

A eficiência da subclonagem foi melhor com o vetor pRSET A do que com o vetor pGEX 4T-2. O pRSET A tem 2,9 kb, o pGEX 4T-2, 4,9 kb e o inserto, 747 bp. Os resultados indicam que a relação entre o número de pares de base do vetor e do inserto foi importante na eficiência da clonagem. Quanto maior foi o vetor em relação a um dado inserto, menor foi a eficiência da clonagem. Por outro lado, quanto maior o inserto em relação a um dado vetor, maior a eficiência da clonagem.

5.2. Produção das proteínas recombinantes GST-IFNAR2cEC

Não houve a expressão protéica da IFNAR2cEC nas cepas *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com o pRSET-IFNAR2cEC em todas as colônias que continham os plasmídeos recombinantes (Figuras 14 e 15). Para examinar as causas possíveis dessa falha de expressão, foi examinado se o gene de IFNAR2cEC possui códons raros (ex. códons para arginina AGA/ AGG que ocorrem infreqüentemente em *E. coli*). A *E. coli* usa somente três ou quatro códons para cada 1000 códons (NAKAMURA, 2000) e esses códons têm sido fatores limitantes na expressão bacteriana de vários genes de mamíferos. Foram identificados 3 códons AGA no gene de IFNAR2cEC, porém eles estão localizados distantes entre si. Mas esses códons distantes entre si normalmente não produzem essas limitações. Portanto, pode ter acontecido algum problema na transcrição ou tradução da proteína (GOLDBERG & GOFF, 1986).

As cinco colônias (Nº 2, 4, 6, 10 e 13) de *E. coli* DH5 α transformadas com plasmídeo recombinante pGEX-IFNAR2cEC (Tabela 4) foram submetidas à expressão protéica por adição de IPTG. Houve abundante expressão protéica da IFNAR2cEC em 4 colônias (Nº 2, 4, 6 e 13) em forma de fusão C- terminal com GST (Figura 16). O sucesso da expressão provavelmente se deve ao fato de que a proteína recombinante IFNAR2cEC se mantém estável em forma de fusão com GST sem sofrer algum dano ou degradação. Então, a partir das etapas de extração e purificação da proteína recombinante, foi utilizada somente a colônia Nº 2. Por outro lado, a colônia Nº 10, não apresentou a expressão protéica (dado não mostrado). Quando foi analisada a seqüência do inserto nas colônias Nº 2 e 10 para verificação da identidade do inserto com a seqüência do DNA da IFNAR2cEC, as duas colônias mostraram a mesma seqüência e apresentaram troca de nucleotídeo (G→A na posição 451) em relação à seqüência original (Domanski *et al.*, 1995), o que provocou a substituição do aminoácido Valina (V151) para o aminoácido Metionina (M151). Porém, os estudos realizados sobre os sítios de ligação da IFNAR 2 até esse momento,

não atribuem nenhuma importância à esse aminoácido (PIEHLER & SCHREIBER, 1999, ROISMAM *et al.*, 2001, CHILL *et al.*, 2002).

A proteína recombinante IFNAR2cEC em forma de fusão com GST, denominada de GST-IFNAR2cEC, foi produzida inicialmente de forma insolúvel em corpos de inclusão. A formação de corpos de inclusão em *E. coli* continua sendo uma barreira significativa para a purificação da proteína recombinante, ainda que ela ofereça alta quantidade de proteína expressa e de fácil isolamento pela sua insolubilidade. Corpos de inclusão contendo proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* consistem na maioria em grandes agregados de forma insolúvel causados pela interação hidrofóbica ou covalente entre monômeros expressos (WETZEL *et al.*, 1990). A proteína expressa na forma de corpos de inclusão necessita de solubilização com um agente desnaturante, como por exemplo, uréia 8 M ou guanidina-HCl 6 M, seguida de renaturação (*refolding*) por diálise gradativa, utilizando um tampão contendo o desnaturante em concentração decrescente. Estes processos são muito laboriosos, e após todo esse processo, o rendimento final da proteína recombinante é reduzido significativamente. Também, a renaturação pela diálise não recupera totalmente a conformação natural da proteína recombinante, e muitas vezes ela perde sua atividade biológica (RUDOLPH & LILIE, 1996).

Para minimizar a formação de corpos de inclusão foram testadas várias condições como foi mostrado na tabela 5. A proteína recombinante GST-IFNAR2cEC de forma solúvel foi obtida quando a proteína recombinante foi expressa a 25 °C e foi lisada por *French Press*. A quantidade da proteína expressa a 25 °C diminuiu significativamente quando comparado com a 37 °C. Em muitos casos, a produção alta em si, ou seja, a concentração alta da proteína recombinante é suficiente para induzir a formação de agregados biologicamente inativos (GRIBSKOV & BURGESS, 1983). O rendimento da proteína nativa (natural) depende da velocidade de *folding*, da velocidade de agregação e da velocidade de síntese da proteína. Nosso resultado confirmou que a expressão proteica a baixa temperatura (25 °C) favoreceu a formação de proteína solúvel reduzindo a velocidade da expressão proteica, o que, por sua vez, favoreceu o *folding* natural, minimizando a formação de corpos de inclusão. A obtenção da proteína

solúvel pela lise por *French Press* foi inesperada. Inicialmente, utilizou-se sonicação para lise celular e observou-se que, após a lise celular, uma boa quantidade de proteínas bacterianas ficou no sedimento embora elas sejam reconhecidamente solúveis. Isso nos levou a supor que a sonicação foi ineficiente para isolamento da proteína solúvel causando alguma denaturação devido ao aquecimento da proteína. Quando foi avaliada a lise por *French Press*, que lisa as células bacterianas por pressão elevada sem aquecimento, observou-se que essa foi melhor para isolamento da proteína solúvel.

A chaperonina Gro EL/ES não foi eficiente para impedir agregação da GST-IFNAR2cEC. Para ter efeito, alguma chaperonina adicional pode ser necessária, pois tem sido relatado que vários membros da família das chaperoninas cooperam entre si para realização de *folding* (BUCHNER, 1996, LANGER *et al.*, 1992). Recentemente, tem-se demonstrado que um *folding* errado e irreversível ocorre quando a proteína é encapsulada na Gro EL/ES por período estendido, por exemplo quando o ciclo de encapsulamento e liberação da proteína é desacelerado (GRALLERT *et al.*, 2000). A causa da ineficiência da Gro EL/ES no *folding* da GST-IFNAR2cEC no presente estudo é uma questão interessante para futuras investigações.

A obtenção da proteína recombinante de forma solúvel, contendo uma boa quantidade e pureza (1,5 – 2 mg por litro de cultura celular) possibilitou o rendimento suficiente para os ensaios biológicos.

Para obtenção da proteína recombinante IFNAR2cEC sem a proteína de fusão, foram encontradas várias dificuldades. Primeiro, a trombina clivou a GST-IFNAR2cEc de forma inespecífica, resultando em várias bandas (Figuras 22 e 23). Segundo, a IFNAR2cEC clivada por trombina permaneceu ligada na resina, não sendo eluída pela glutatona reduzida (Figuras 22B e 23B). Portanto, infelizmente, não foi possível utilizar a proteína recombinante IFNAR2cEC para os ensaios biológicos.

Nguyen e cols. (1996) expressaram o domínio extracelular do IFNAR1 em *E. coli* em forma de proteína de fusão com GST, mostrando que essa proteína inibe a atividade antiviral e antiproliferativa do IFN- α . Recentemente, Han e cols (2001) produziram o domínio extracelular do IFNAR 2 ovino em forma de proteína de fusão com GST (GST-R2E),

mostrando que a GST-R2E foi capaz de ligar ao IFN- τ 4. Além disso, têm sido relatados vários trabalhos que mostraram alta atividade biológica da proteína de fusão (RAHMAN *et al.*, 1992, HARDY, *et al.*, 2001). Por esses motivos, decidiu-se pela realização de testes biológicos com a proteína de fusão GST-IFNAR2cEC.

5.3. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiproliferativa do rIFN- α 2

A proteína recombinante GST-IFNAR2cEC não bloqueou a atividade antiproliferativa de 1 U (24,5 pM) e 2 U (49 pM) de rIFN- α 2 nas células da linhagem Daudi, embora tenha sido usada uma quantidade de GST-IFNAR2cEC 20.000 vezes maior que a de IFN. Com a colaboração da Dra Hana Schmeisser (Division of Therapeutic Proteins, CBER, FDA, USA), verificou-se que a GST-IFNAR2cEC é capaz de ligar-se ao IFN- α pelo teste ELISA. A causa verdadeira da inatividade da GST-IFNAR2cEC no bloqueio da atividade antiproliferativa do IFN- α , mesmo com sua capacidade de ligação ao IFN- α , continua desconhecida até o presente momento. Porém, 4 explicações possíveis podem ser sugeridas. Primeiro, a atividade antiproliferativa do IFN- α pode não estar relacionada com a expressão do IFNAR 2c na superfície da célula. Yano e cols. (1999) utilizaram 11 linhagens de células humanas de câncer de fígado e mostraram que o IFN- α pode inibir o crescimento celular induzindo a inibição do ciclo celular com/sem apoptose, independentemente da quantidade da proteína IFNAR 2 expressa na superfície das células. Sun e cols (1998) observaram que não houve diferença de expressão do mRNA do IFNAR 1 entre as células antes ou depois de 48 h de incubação com IFN- α . Tem se relatado também, que o efeito antiproliferativo do IFN- α é intermediado por componentes da sinalização do receptor de célula T (TCR) e a ativação da sinalização JAK-STAT é insuficiente para indução da atividade antiproliferativa do IFN- α (PETRICIOIN *et al.*, 1997). Isto parece indicar que o IFN- α pode ter atividade antiproliferativa mesmo sem se ligar à IFNAR, ou seja, pode ter outro mecanismo de ação na inibição do crescimento celular. Portanto, mesmo

que o IFN- α esteja ligado à proteína recombinante GST-IFNAR2c, é possível que ele seja capaz de inibir o crescimento celular. Seria interessante investigar o mecanismo da ação antiproliferativa do IFN- α nas células Daudi, pois isso pode ser útil para tratamento de câncer, incluindo leucemia pilosa e leucemia mielóide crônica. Segundo, é bem possível que tenha ocorrido a reação reversível entre [IFN- α][GST-IFNAR2cEC] e [IFN- α][IFNAR na superfície das células Daudi] durante a incubação de 3 dias, favorecendo ligações do IFN- α ao IFNAR1/IFNAR2 da superfície das células já que o IFN- α é tridimensionalmente mais favorável à ligação, ou seja, deixando que o IFN- α exerça sua atividade antiproliferativa. Terceiro, a proteína recombinante produzida em *E. coli* pode possuir uma estrutura diferente, já que não sofre modificação pós-traducional. Quarto, há possibilidade de que a estrutura protéica da GST-IFNAR2cEC tenha conformação terciária diferente da IFNAR 2c natural. A proteína GST pode comprometer a estrutura da IFNAR2cEC, tendo uma interação indesejada com parte da IFNAR2cEC. Então, essa estrutura modificada pode resultar numa ligação ineficiente para o bloqueio da ação do IFN- α .

5.4. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC sobre a atividade antiviral do rIFN- α 2

Ao avaliar a atividade bloqueadora da atividade antiviral do IFN- α , utilizou-se células da linhagem Hep 2/c (carcinoma epidermóide) e vírus EMC. Essa combinação mostrou-se bastante sensível à atividade antiviral do rIFN- α 2, mostrando 75, 87,5, 90,9, 97,2 % de inibição do ECP nas concentrações 1, 2, 4 e 8 U de IFN. Porém, a proteína recombinante GST-IFNAR2cEC não bloqueou a atividade antiviral de 1 U (24,5 pM), 2 U, 4 U e 8 U de rIFN- α 2 nas células da linhagem Hep2/c, embora tenha sido usada uma quantidade de GST-IFNAR2cEC bastante elevada. Conforme comentado no item 5.3, é possível que o tempo de incubação elevado e diferenças de conformação 3D entre a estrutura da proteína recombinante e

a do receptor natural tenham favorecidos a ligação do IFN- α ao receptor natural da superfície celular.

Piehler & Schreiber (1999) expressaram em *E. coli* o domínio extracelular do IFNAR2 (25 kDa). Essa proteína foi produzida em forma de corpos de inclusão (insolúvel), solubilizada com uréia a 8 M e renaturada por diluição de 20 vezes por uma noite (*refolding*). Eles mostraram que essa proteína, em concentrações maiores que 100 nM, inibiu completamente a atividade antiviral do IFN- α 2 (25 U/mL) em células da linhagem WISH (células amnióticas humanas). Por outro lado, a proteína recombinante do domínio extracelular do IFNAR 2 ovino (ovR2E) produzido em *E. coli* (Han *et al.*, 2001) não inibiu a atividade antiviral do ovIFN- τ 4 em células da linhagem MDBK (células de rim bovino Madin-Darby), mesmo com sua capacidade de ligação ao ovIFN- τ 4. A K_d do ovR2E com ovIFN- τ 4 (70 nM) é muito alta para esse receptor competir eficientemente com IFNAR1/IFNAR2 natural da superfície celular da célula MDBK, que se liga com o ovIFN- τ 4 com $K_d \approx 0,3$ nM. Foi observado que o ovR2E mostrou atividade antiviral na ausência do ovIFN- τ 4 e ativou o ISGF 3, resultado atribuído a uma possível homodimerização da ovR2E com a IFNAR 2. Foram reportados casos da IFNAR 2a murina (mulfnar-2a) recombinante operando como fator determinante da ação antiproliferativa do IFN- α em timócitos primários de camundongo *lfnar-2^{-/-}* (camundongo deficiente de *lfnar-2*) (HARDY *et al.*, 2001). A mulfnar-2a é uma variante do receptor do IFN tipo I produzida pelo processamento do mesmo gene, e que tem somente o domínio extracelular. Hardy e cols sugeriram que mulfnar-2 forma um hetero-dímero com a IFNAR 1 na ausência da IFNAR-2 para atividade antiproliferativa. A atividade antiviral não foi avaliada nesse estudo.

No presente estudo, a proteína GST-IFNAR2cEC foi produzida em forma solúvel, sem sofrer desnaturação por uréia e *refolding* como foi feito no trabalho de Piehler & Schreiber (1999), o que favorece sua atividade biológica. Mas, no presente estudo, foram utilizadas células da linhagem Hep 2/c e Piehler & Schreiber utilizaram células da linhagem WISH. Essa diferença nas células pode ser a explicação para os diferentes resultados. A

GST-IFNAR2cEC não mostrou atividade antiviral e nem antiproliferativa na ausência do IFN- α .

Os estudos apresentados acima mostram efeitos variados do domínio extracelular da IFNAR 2 recombinante (IFNAR 2 solúvel) para diferentes tipos células. Essa variedade de resultados sugere que muitos detalhes dos efeitos dessa proteína precisam ser mais bem esclarecidos. Observa-se que testes baseados nas atividades antiproliferativa e antiviral do IFN- α não são adequados para esclarecimento do mecanismo de ação ou verificação precisa dos efeitos dessa proteína em sua relação com as atividades do IFN- α .

5.5. Avaliação da expressão gênica da 2',5'-OAS e do STAT 1 por RT-PCR nas células Daudi e Hep 2/c estimuladas com diferentes concentrações de rIFN- α 2.

Iniciou-se a avaliação da expressão gênica da 2',5'-OAS e do STAT1 com 2 objetivos. Primeiro, para minimizar o tempo de incubação com o IFN- α , esperando-se assim aumentar a atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC. Os ensaios antiproliferativo e antiviral necessitam de tempo de incubação com o IFN- α e a GST-IFNAR2cEC de três dias e de 1 dia respectivamente. Longos períodos de incubação desfavorecem a ligação competitiva da GST-IFNAR2cEC ao IFN- α com IFNAR1/IFNAR2 natural da superfície das células. A avaliação da expressão do mRNA dos genes estimulados pelo IFN- α necessita de apenas 4 h de incubação (PATTYN *et al.*, 1999). Segundo, para avaliar a atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC ao nível da expressão do mRNA dos genes estimulados pelo IFN- α . Isto pode também esclarecer o mecanismo de ação do IFN- α e da proteína recombinante ao nível da expressão gênica nas células Daudi e Hep 2/c.

As principais ações biológicas de IFN- α são atividade antiviral e atividade antitumoral por meio das proteínas efetoras tais como: a 2', 5'-oligoadenilato sintetase (2', 5'-OAS), as quinases Tyk2 e Jak 1, proteína Mx e outros. Por essa razão, vários estudos sobre mecanismo da ação e

estrutura-função de IFN- α baseiam-se na avaliação da ativação dessas proteínas efetoras. Além disso, a avaliação da expressão protéica do STAT 1 e STAT 2 tem sido usada intensamente devido ao seu papel essencial para formação do ISGF 3, que é o sinalizador para genes responsáveis pela ação do IFN- α (IMADA & LEONARD, 2000, KOTENKO *et al.*, 1999, RUSSELL-HARDE *et al.*, 2000, SUN *et al.*, 1998).

A 2',5'-OAS é a enzima crucial na resposta antiviral induzida pelo IFN- α . Sun e cols. (1998) observaram que a expressão do mRNA da 2',5'-OAS foi significativamente aumentada nas células HUT78S (linfoma de célula T cutânea) tratadas com IFN- α . Pattyn e cols (1999) observaram aumento da expressão do mRNA da 2',5'-OAS de modo dependente da concentração do IFN- α nas células 2fTGH (Sarcoma humana). Portanto, a avaliação da 2',5'-OAS seria muito importante no presente estudo.

Estudos realizados até o momento a respeito relações entre o STAT 1 e o IFN concentram-se principalmente em estudos de detecção da ativação do STAT 1 por fosforilação, da presença do STAT 1 por análise de mRNA ou da formação de complexos ISGF 3. (SUN *et al.*, 1998, DONDI *et al.*, 2001 e outros). Alguns trabalhos mostram também que a expressão gênica do STAT 1 é induzida indiretamente pela ação do IFN- α (MELÉN *et al.*, 2000, LEHTONEN *et al.*, 1997). Embora o STAT 1 seja uma proteína sinalizadora expressada constitutivamente, Lehtonen e cols (1997) observaram que IFN- α aumenta a expressão gênica do STAT 1 juntamente com STAT 2 em células humanas mononucleares do sangue periférico e macrófagos. No presente estudo, a avaliação da expressão gênica do STAT 1 foi proposta para uma investigação que possibilitasse uma melhor compreensão do papel e da importância dessa proteína. Foi observado que o STAT 1 é expresso em pequena quantidade na ausência de IFN- α 2 (Figuras 28 e 35) nas células Hep 2/c e Daudi, o que corresponde ao STAT 1 constitutivo. Pela análise semi-quantitativa, verificou-se que a expressão gênica do STAT 1 nas células Hep 2/c e Daudi aumentou significativamente com o aumento da concentração do IFN- α 2 (Figura 39). Possivelmente, o STAT 1 produzido pelo estímulo de IFN- α é usado para formação de complexos para ativar a transcrição de vários genes estimulados pelo IFN- α 2.

A expressão gênica do STAT 1 e 2', 5'-OAS das células Daudi aumenta significativamente com 1 U de IFN- α 2 e das células Hep 2/c com 10 a 20 U. Entretanto, não se pode afirmar com segurança a partir desses dados que as células Daudi são mais sensíveis que as células Hep 2/c ao estímulo do IFN- α , já que o número de células Daudi usado (1×10^6 células) foi duas vezes maior que o de células Hep 2/c (5×10^5 células).

Os comportamentos proporcionais da expressão gênica entre STAT 1 e 2', 5'-OAS como pode se observar na figura 39 sugerem que realmente existe uma relação causa-efeito entre a expressão gênica do STAT 1 e 2', 5'-OAS. Além disso, supondo que cada célula estimulada por IFN- α produza mesma quantidade do STAT 1 e 2', 5'-OAS independente da quantidade de IFN- α , a proporcionalidade é facilmente explicada se supormos que uma quantidade maior de IFN- α estimula uma maior de quantidade de células.

Esse estudo foi necessário para a determinação da concentração adequada do rIFN- α 2 a ser utilizada no estudo de avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC ao nível da expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS nas células Daudi e Hep 2/c. Além disso, esse estudo mostrou claramente que a expressão gênica do STAT 1 foi estimulada por IFN- α .

5.6. Avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS, utilizando células da linhagem Daudi e Hep 2/c

Baseando-se nos resultados descritos acima, foram utilizadas 1 e 10 U de rIFN- α 2 para células Daudi, e 10 e 20 U para células Hep 2/c para avaliação da atividade bloqueadora da GST-IFNAR2cEC na expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS.

A expressão gênica do STAT 1 não foi inibida pela GST-IFNAR2cEC nas células Daudi e Hep 2/c, porém a da 2', 5'-OAS foi. É fato bem estabelecido que a ligação do IFN- α ao receptor é condição necessária para a produção de várias proteínas efetoras, entre elas a 2', 5'-OAS. Pattyn e cols (1999) mostraram que a sinalização efetuada pelo domínio intracelular

do IFNAR é suficiente para a expressão gênica de 2', 5'-OAS, MxA, PKR e p56 nas células 2fTGH (fibrosarcoma humana). Baseando-se nesse último resultado, pode-se supor que, para as células Daudi e Hep 2/c, essa sinalização efetuada pelo receptor também é suficiente para a expressão gênica da 2', 5'-OAS. Como no presente estudo, a expressão gênica da 2', 5'-OAS foi inibida, conclui-se que de algum modo a ligação do IFN- α ao IFNAR (e, conseqüentemente, a sinalização) foi prejudicada pela GST-IFNAR2cEC nas células Daudi e Hep 2/c. Possivelmente, a GST-IFNAR2cEC foi capaz de se ligar ao IFN- α e prejudicar a ligação deste à IFNAR 2. A GST, usada como controle nesses experimentos, também foi capaz de inibir a expressão gênica da 2', 5'-OAS nas células Hep 2/c. Essa inibição ocorreu por mecanismo desconhecido, embora necessariamente relacionado à ligação do IFN- α ao IFNAR.

Não foi detectada diferença significativa na expressão gênica do STAT 1 com a adição de GST-IFNAR2cEC ou de GST. Isso indica que a produção do STAT 1 e da 2', 5'-OAS ativadas pelo IFN- α foram feitas por mecanismos diferentes. Não foi encontrado na literatura nenhum mecanismo conhecido para a produção do STAT 1 pela ação do IFN- α . Melén e cols (2000) sugerem que IFN- α estimula produção de suas próprias proteínas sinalizadoras por meio de vários mecanismos diferentes. A expressão gênica do STAT 1 no presente estudo pode ter sido estimulado pelo IFN- α por dois tipos de mecanismos: (1) A ligação do IFN- α ao receptor, ainda que incompleta, foi capaz efetuar uma sinalização suficiente para expressão gênica do STAT 1. (2) A expressão gênica do STAT 1 foi estimulada pelo IFN- α por meio de um mecanismo independente do IFNAR. Primeiro caso, a GST-IFNAR2cEC pode ter sido ligada ao IFN- α , por sua vez, ligou-se à IFNAR 1, o que teria sido suficiente para efetuar alguma sinalização.

A figura 44 ilustra os possíveis mecanismos que explicariam esses resultados. A figura 44A mostra que a expressão gênica do STAT 1 pode depender de dois caminhos possíveis, enquanto que a da 2', 5'-OAS depende somente da sinalização por meio do receptor. A figura 44B mostra a inibição que ocorreu. A expressão gênica da 2', 5'-OAS foi inibida devido à

uma ligação ineficiente do IFN- α ao seu receptor, enquanto que a do STAT 1 foi ativada por outro mecanismo diferente.

Figura 44. Possíveis mecanismos ocorridos antes (A) e depois (B) da adição da GST-IFNAR2cEC para a expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS nas células Daudi e Hep 2/c.

A proteína recombinante GST-IFNAR2cEC no presente estudo não mostrou boa eficiência como inibidor da ação do IFN- α como foi observado pelos ensaios antiproliferativo e antiviral. Porém, o estudo do efeito bloqueador pela expressão gênica mostrou que a GST-IFNAR2cEC pode ser útil como uma ferramenta para exploração do mecanismo da ação do IFN- α e seu receptor. Além disso, a GST-IFNAR2cEC pode nos trazer entendimento da função da IFNAR 2 solúvel, pois a presença dessa IFNAR 2 solúvel em organismos pode exercer uma função regulatória sobre a ação do IFN- α como antagonista ou como agonista. (HARDY et al., 2001).

6. CONCLUSÃO

- 1) A obtenção da proteína recombinante GST-IFNAR2cEC de forma solúvel, contendo boa quantidade e pureza (1,5 ~ 2 mg por litro de cultura celular) possibilitou rendimento suficiente para os ensaios biológicos.
- 2) A GST-IFNAR2cEC não bloqueou as atividades antiproliferativa e antiviral do IFN- α 2 nas células da linhagem Daudi e Hep 2/c.
- 3) A expressão gênica do STAT 1 e 2',5'-OAS das células Daudi aumenta significativamente com 1 U de IFN- α 2 e das células Hep 2/c, com 10 a 20 U.
- 4) As quantidades de expressão gênica do STAT 1 e da 2', 5'-OAS foram proporcionais entre si para estímulos com diferentes concentrações de IFN- α 2.
- 5) O IFN- α 2 estimula a produção do STAT 1 que é próprio sinalizador para sua ação.
- 6) A expressão gênica do STAT 1 não foi inibida pela GST-IFNAR2cEC nas células Daudi e Hep 2/c, porém inibiu-se a da 2', 5'-OAS. Estes resultados sugerem que a expressão gênica do STAT 1 é independente da ligação do IFN- α com a IFNAR 2c, e que a da 2', 5'-OAS é dependente dessa ligação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABDI, E.A., VENNER, P.A. Immune thrombocytopenia after alpha-interferon therapy in patients with cancer. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.255, p.1878-1879, 1986.

ABRAMOVICK, C., SHULMAN, L.M., RATOVITSKI, E., HARROCH, S., TOVEY, M., EID, P., REVEL, M. Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN- α and IFN- β . **EMBO J.**, Oxford, v.13, p.5871-5877, 1994.

ABBAS A.K., MURPHY K. M., SHER A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, London, v.383, p.787-793, 1996.

AFIFI, M.S., KUMAR, V., BENNETT, M. Stimulation of genetic resistance to marrow grafts in mice by interferon α/β . **J. Immunol.**, Baltimore, v.134, p.37-39, 1985.

al-JANADI M., al-BALLA, S., al-DALAAN, A., RAZIUDDIN, S. Cytokine-profile in SLE, RA e other rheumatic diseases. **J. Clin. Immunol.**, New York, v.13, p.58-67, 1993.

ANTIN, J.H., FERRARA, J.L.M. Cytokine dysregulation and acute GVHD. **Blood**, New York, v.80, p.2964-2968, 1992.

BANKHURST, A.D. Interferons and systemic erythematosus. **J. Rheumatol.**, Toronto, v.13, p.63-67, 1987.

BARON, S., COPPENHAVER, D.H., DIANZANI, F., FLEISCHMANN Jr., W.R., HUGHES Jr., T.K., KLIMPEL, G.R., NIESEL, D.W., STANTON, J.G., TYRING, S.K. Introduction to the interferon system. In: BARON, S., COPPENHAVER, D.H., DIANZANI, F., FLEISCHMANN Jr., W.R., HUGHES Jr., T.K., KLIMPEL, G.R., NIESEL, D.W., STANTON, J.G., TYRING, S.K. **Interferon: principles and medical applications**. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1992. p.1-15.

* De acordo com a norma NBR 6032/89, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 1998.

- BARON, S., DIAZANI, F. The interferons: biological system with therapeutic potential in viral infections. **Antivir Res.**, Amsterdam, v. 24, p.97-110, 1994.
- BARRETT, A. J. Graft versus host disease-Clinical features and biology. **Bone Marrow Transplant.**, New York, v.4, p.18-22, 1989.
- BELARDELLI, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. **APMIS**, Copenhagen, v.103, p.161-179, 1995.
- BENIZRI, E., GUGENHEIM, J., LASFAR, A., EID, P., BLANCHARD, B., LALLEMAND, C., TOVEY, M.G. Prolonged allograft survival in cynomolgus monkeys treated with a monoclonal antibody to the human type I interferon receptor and low doses of cyclosporine. **J. Int. cyt. Res.**, New York, v18, p.273-284, 1998.
- BENOIT, P., MAGUIRE, D., PLAVEC, I., KOCHER, H., TOVEY, M., MEYER F. A monoclonal antibody to recombinant human IFN- α receptor inhibits biologic activity of several species of human IFN- α , IFN- β , and IFN- ω . **J. Immunol.**, Baltimore, v.150, p.707-716, 1993.
- BRANCA, A. Interferon receptors. **In vitro Cell Dev. Biol.**, Columbia, v.24, p.155-165, 1988.
- BROWETT, P.J., NELSON, J., TIWARI, S., VAN DE WATER, N.S., MAY, S., PALMER, S.J. Graft-versus-host disease following interferon therapy for relapsed chronic myeloid leukaemia post-allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, New York, v.14, p.641-644, 1994.
- BUCHNER, J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. **FASEB J.**, Bethesda, v.10, p.10-19, 1996.
- BURGESS, R.R. Purification of overproduced *Escherichia coli* RNA polymerase σ factors by solubilizing inclusion bodies and refolding from sarkosyl. **Methods Enzymol.**, New York, v.273, p.145-149, 1996.
- CANTELL, K., HIRVONEN, S. Large-scale production of human leukocyte interferon containing 10^8 units per ml. **J. Gen. Virol.**, Colchester, v.39, p.541-543, 1978.
- CHANG, J.Y., ALKAN, S.S., HILSCHMANN, N., BRAUN, D.G. Thrombin specificity: selective cleavage of antibody light chains at the joints of variable with joining regions and joining with constant regions. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v.151, p.225-230, 1985.
- CHILL, J.H., NIVASCH, R., LEVY, R., ALBECK, S., SCHREIBER, G., ANGLISTER, J. The human interferon receptor: NMR-based modeling, mapping of the IFN- α 2 binding site, and observed ligand-induced tightening. **Biochemistry**, Columbus, v.41, p.3575-3585, 2002.

- CHOMCZYNSKY P., SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical. Biochem.**, Orland, v.162, p.156-159, 1987.
- CHUNTHARAPAI, A., LAI, J., HUANG, X., GIBBS, V., KIM, K.J., PRESTA, L.G., STEWART, T.A. Characterization and humanization of a monoclonal antibody that neutralizes human leukocyte interferon: a candidate therapeutic for IDDM and SLE. **Cytokine**, v.15, p.250-260, 2001.
- CLARKE, A.R. Molecular chaperones in protein folding and translocation. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, Oxford, v.6, p.43-50, 1996.
- CLEVELAND, H.G., ANNABLE, C.R., KLIMPEL, G.R. In vivo and in vitro production of interferon beta and interferon gamma during graft versus host disease. **J. Immunol.**, Baltimore, v.141, p.3349-3356, 1988.
- CLEVELAND, H.G., LANE, R.G., KLIMPEL, G.R. Enhanced interferon alpha/beta and defective interferon gamma production in chronic graft versus host disease in potential mechanism for immunosuppression. **Cell Immunol.**, New York, v.110, p.120-130, 1987.
- COHEN, B., NOVICK, D., BARAK, S., RUBINSTEIN, M. Ligand-induced association of the type I Interferon receptor components. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v.15, p.4208-4214, 1995.
- COLAMONICI, O.R., DOMANSKI, P., KROLEWSKI, J.J., FU, X., REICH, N.C., PFEFFER, L.M., SWEET, M.E., PLATANIAS, L.C. Interferon α (IFN α) signaling in cells expressing the variant form of the type I IFN receptor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.269, p.5660-5665, 1994.
- COLAMONICI, O. R., UYTENDAELE, H., DOMANSKI, P., YAN, H., KROLEWSKI, J. J. p135^{tyk2}, an Interferon- α -activated Tyrosine Kinase, is physically associated with an Interferon- α receptor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.269, p.3518-3522, 1994.
- CONSTANTINESCU, S.N., CROZE, E., MURTI, A., WANG, C., BASU, L., HOLLANDER, D., RUSSELL-HARDE, D., BETTS, M., GARCIA-MARTINEZ, V., MULLERSMAN, J.E., PFEFFER, L.M. Expression and signaling specificity of the IFNAR chain of the type I interferon receptor complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.92, p.10487-10491, 1995.
- CUTRONE, E.C., LANGER J.A. Contributions of cloned type I interferon receptor subunits to differential ligand binding. **FEBS lett.**, Amsterdam, v.404, p.197-202, 1997
- De MAEYER, E., De MAEYER-GUIGNARD, J., Interferons. In: **Cytokines**, 1994. p.265-288.

- DER, S. D., YANG, Y-L., WEISSMANN, C., WILLIAMS, B.R.G. A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.94, p.3279-3283. 1997.
- DOMANSKI, P., WITTE, M., KELLUM, M., RUBINSTEIN, M., HACKETT, R., PITHA, P., COLAMONICI, O.R. Cloning and expression of a long form of the β subunit of the interferon $\alpha\beta$ receptor that is required for signaling. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.270, p.21606-21611, 1995.
- DONDI E., PATTYN E., LUTFALLA G., OSTADE X.V., UZÉ G., PELLEGRINI S. & TAVERNIER J. Down-modulation of Type I Interferon Responses by Receptor Cross-competition for a Shared Jak Kinase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.276, p.47004-47012, 2001.
- EGOROVA, O.N., BALABANOVA, R.M. Systemic lupus erythematosus induced by recombinant alpha IFN. **Med. Clin.**, Barcelona, v.102, p.198, 1994.
- EVINGER, M., PESTKA, S. Assay of growth inhibition in lymphoblastoid cell cultures. **Methods Enzymol.**, New York, v.79, p. 362-368, 1981.
- FELDMAN, M., BRENNAN, F.M., MAINI, R.N. Role of cytokines in autoimmune disease. In: AGGARWAL, B.B., PURI, R.K., eds. **Human cytokines: their role in disease and therapy**. Cambridge, 1995. p.185-194.
- FLORES, A., OLIVE, A., FELIU, E., TENA, X. Systemic lupus erythematosus following IFN therapy. **Br. J. Rheumatol.**, Oxford, v.33, p.787, 1994.
- FUKUYAMA, S., KAJIWARA E., SUZUKI N., MIYAZAKI N., SADOSHIMA S., ONOYAMA K. Systemic lupus erythematosus after α -interferon therapy for chronic hepatitis C: A case report and review of the literature. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v.95, p.310-312, 2000.
- GOLDBERG, A.L., GOFF, A.S. The selective degradation of abnormal proteins in bacteria. In: REZNIKOFF W, GOLD L eds. **Maximizing gene expression**, 1986, p.287-314.
- GOODBOURN, S., DIDCOCK, L., RANDALL, R.E. Interferons: cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures, **J. Gen. Virol.**, Colchester, v.81, p.2341-2364, 2000.
- GRESSER I., MOREL-MAROGER, L., VERRROUST, P., RIVIERE, Y., GUILLON, J.C. Anti-interferon globulin inhibits the development of glomerulonephritis in mice infected at birth with lymphocytic choriomeningitis virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.75, p.3413-3416, 1978.

- GRODBERG, J., DUNN, J.J. *ompT* encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. **J Bacteriol.**, Washington, v.170, p.1245-53, 1988.
- GROSSBERG, S.E., TAYLOR, J.L., KUSHNARYOV, V.M. Interferon receptors and their role in interferon action. **Experientia**, Basel, v.45, p.508-513, 1989.
- GUERCI, A.P., GUERCI, B., LEVY-MARCHAL, C., ONGAGNA, J., ZIEGLER, O., CANDILOROS, H., GUERCI, O., DROUIN, P. Onset of insulin dependent diabetes mellitus after interferon alpha therapy for hairy cell leukemia. **Lancet**, London, v.343, p.1167-1168, 1994.
- HAN, C.S., CHEN, Y., EZASHI, T., ROBERTS, R.M. Antiviral activities of the soluble extracellular domains of type I interferon receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.98, p.6138-6143, 2001.
- HARDY, M.P., OWCZAREK, C.M., TRAJANOVSKA, S., LIU, X., KOLA, I., HERTZOG, P.J. The soluble murine type I interferon receptor Ifnar-2 is present in serum, is independently regulated, and has both agonistic and antagonistic properties. **Blood**, New York, v.97, p.473-482, 2001.
- HERBERMAN, R.B. Effect of α -interferons on immune function. **Semin. Oncol.**, Orland, v.24(suppl 9), p.78-80, 1997
- HEREMANS, H., BILLIAU, A., De SOMER, P. Failure of antibodies to interferon- α/β to delay the development of autoimmune disease in NZB/NZW F1 mice. In: KIRCHNER & SCHELLEKENS eds. **The biology of the interferon system**. Amsterdam: Elsevier Science, 1985. p. 461-465. [Proceedings of the TNO-ISIR Meeting of the Interferon System, Heidelberg, 1984].
- HEREMANS, H., BILLIAU, A. The potential role of interferons and interferon antagonists in inflammatory disease. **Drugs**, Auckland, v.38, p.957-972, 1989.
- HEREMANS, H. BILLIAU A., COLOMBATI A., HILGERS J., DE SOMER P. Interferon treatment of NZB mice: accelerated progression of autoimmune disease. **Infect. Immun.**, Washington, v.21, p.925-930, 1978.
- HIRATA, M.H., SACKETT, D., HIRATA, R.D.C., NGUYEN, N.Y. Human interferon- α receptor: Identification of the region involved in binding to Interferon- α B. **J. Int. Cyt. res.**, New York, v.16, p.839-848, 1996.
- HORY, B., BLANC, D., SAINT-HILIER, Y. Sytstemic lupus erythematosus-like sybdrome induced by alpha-interferon therapy. **Eur. J. Med.**, Paris, v.1, p379, 1992

- HUANG, Z., FASCO, M., KAMINSKY, L. Optimization of DNase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. **BioTechniques**, Natick, v.20, p.1012-1020, 1996.
- ISAACS, A., LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proc. R. Soc. London Ser. B.**, London, v.147, p.258-273, 1957.
- JADUS, M.R., WEPSIC, H.J. The role of cytokines in graft-versus-host reactions and disease. **Bone Marrow Transplant.**, New York, v.10, p.1-14, 1992.
- JOHNSTON, M.D. Enhanced production of interferon from human lymphoblastoid (Namalwa) cells pre-treated with sodium butylate. **J. Gen. Virol.**, Colchester, v.50, p.191-194, 1980.
- KING, P., GOODBOURN, S. STAT 1 is inactivated by a caspase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.273, p.8699-8704, 1998.
- KLIMPEL, G.R., FLEISCHMANN Jr., W.R., BARON, S., KLIMPEL, K.D. Mouse bone marrow cells produce a different interferon than do spleen cells in response to alloantigens. **J. Immunol.**, Baltimore, v.129, p.946, 1982.
- KLIMPEL, G.R., KLIMPEL, K.D. Specificity and characterization of cytotoxic cells generated from alloantigen stimulated murine bone marrow cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v.130, p.1084, 1983.
- KLINGEMANN, H.G., GRIGG, A.P., WILKIE-BOYD, K. Treatment with recombinant interferon (α -2 β) early after bone marrow transplantation in patients at high risk for relapse. **Blood**, New York, v.78, p.3306-3311, 1991.
- KONTSEK, P. Human type I interferons: structure and function. **Acta Virol.**, Prague, v.38, p.345-360, 1994.
- KOVARIK, J., MAYER, G., POHANKA, E.R. Adverse effect of low-dose prophylactic human recombinant leukocyte interferon alpha treatment in renal transplant recipients. **Transplantation**, Baltimore, v.45, p.402, 1988.
- LAFAILLE, J.J. The role of helper T cell subsets in autoimmune diseases. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.9, p.139-151, 1998.
- LANGER, T., LU, C., ECHOLS, H. FLANAGAN, I., HYER, M.K., HARTL, F.U. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of protein folding. **Nature**, London, v.356, p.683-689, 1992.
- LANGER, J.A., PESTKA, S. Interferon receptors. **Immunol. Today**, Amsterdam, v.9, p.393-400, 1988.

- LEHTONEN, A., MATIKAINEN, S., JULKUNEN, I. Interferons up-regulate STAT 1, STAT 2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages. **J. Immunol.**, Baltimore, v.159, p.794-803, 1997.
- LEWERENZ, M., MOGENSEN, K.E. UZÉ, G. Shared receptor components but distinct complexes for α and β interferons. **J. Mol. Biol.**, Kent, v.282, p.585-599, 1998.
- LI, X., LEUNG, S., KERR, I.M., GEORGE, R., STARK, R. Functional subdomain of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v.17, p.2048-2056, 1997.
- LIBLAU, R.S., SINGER, S.M., MCDEVITT, H.O. Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ specific autoimmune disease. **Immunol. Today**, Oxford, v.16, p.34-38, 1995.
- LIM, J.K., XIONG, J., CARRASCO, N., LANGER, J.A. Intrinsic ligand binding properties of the human and bovine alpha-interferon receptors. **FEBS lett.** Amsterdam, v.350, p281-286, 1994.
- LING, L.E., ZAFARI, M., REARDON, D., BRICKELMEIER, M., GOELZ, S.E. BENJAMIN, C.D. Human type I interferon receptor, IFNAR, is a heavily glycosylated 120-130 kD membrane protein. **J. Int. Cyt. Res.**, New York, v.15, p.55-61, 1995
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.
- LU, J., CHUNTHARAPAI, A., BECK, J., BASS, S., OW, A., De Vos, A.M., GIBBS, V., KIM, K.J. Structure-function study of the extracellular domain of the human IFN-alpha receptor (hIFNAR1) using blocking monoclonal antibodies: the role of domains 1 and 2. **J. Immunol.**, Baltimore, v.160, p.1782-1788, 1998.
- MAKRIDES, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.60, p.512-538, 1996.
- MEAGER, A. Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization. In : CLEMENS, M.J., MORRIS, A.G., GEARING, A.J.H., eds. **Lymphokines and interferons: a practical approach**. Oxford:IRL Press, 1987. p.129-147.
- MELÉN, K., KESKINEN, P., LEHTONEN, A., JULKUNEN, I. Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. **J. Hepatol.**, Amsterdam, v. 33, p.764-772.

- MORRIS, L.F., LEMAK, N.A., ARNETT F.C.Jr., JORDON, R.E., DUVIC, M. Systemic lupus erythematosus diagnosed during interferon alpha therapy. **South. Med. J.**, Birmingham, v.89, p.810-814, 1996
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.** Baltimore, v.136, p.2348-2357, 1986.
- NAKAMURA, Y., GOJOBORI, T., IKEMURA, T. Códon usage tabulated from international DNA sequence databases: Status for the year 2000. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.28, p.292, 2000
- NAGLER, A., BARAK, V., SLAVIN, S. Role of cytokines in graft-versus-host reaction and rejection following allogeneic bone marrow transplantation. In: AGGARWAL, B.B., PURI, R.K., eds. **Human cytokines: their role in disease and therapy**. Cambridge: 1995. p.153-161.
- NGUYEN, N.Y., SACKETT, D., HIRATA, R.D.C., LEVY, D.E., ENTERLENE, J.C., BEKISZ, J.B., HIRATA, M.H. Isolation of a biologically active soluble human interferon- α receptor-GST fusion protein expressed in *Escherichia coli*. **J. Int. Cyt. Res.**, New York, v.16, p.849-856, 1996.
- NICHOLSON, L.B., KUCHROO, V.K. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. **Curr. Opin. Immunol.**, Haywards Heath, v.8, p.837-842, 1996.
- NICOLETTI, F., MERONI, P., DI MARCO, R., BARCELLINI, W., BORGHI, M.O., GARIGLIO, M., MATTINA, A., GRASSO, S., LANDOLFO, S. 34-year-old patient with chronic myelogenous leukemia developing systemic lupus erythematosus after α -IFN therapy. **Am J. Hematol.**, New York, v.41, p.141, 1992.
- NOVICK, D., COHEN, B., RUBINSTEIN, M. The human interferon α/β receptor: characterization and molecular cloning. **Cell**, Cambridge, v.77, p.391-400, 1994.
- PATTYN, E., OSTADE, X.V., SCHAUVLIEGE, L., VERHEE, A., KALAI, M., VANDEKERCKHOVE, J., TAVERNIER, J. Dimerization of the interferon type I receptor IFN α 2-2 is sufficient for induction of interferon effector genes but not for full antiviral activity. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.274, p.34838-34845, 1999.
- PAVORD, S., SIVAKUMARAN, M., DURRANT, S., CHAPMAN, C. The role of alpha interferon in the pathogenesis of GVHD. **Bone Marrow Transplant.**, New York, v.10, p.477, 1992.

- PESTKA, S. The human interferon α species and receptors. **Biopolymers** (Pept Sci), New York, v.55, p.254-287, 2000
- PETRICOIN, E.F., ITO, S., WILLIAMS, B.L., AUDET, S., STANCATO, L.F., GAMERO, A., CLOUSE, K., GRIMLEY, P., WEISS, A., BEELER, J., FINBLOOM, D.S., SHORES, E.W., ABRAHAM, R., LARNER, A.C. Antiproliferative action of interferon- α requires components of T-cell receptor signalling. **Nature**, London, v.390, p.629-632, 1997.
- PFEFFER, L.M., DINARELLO, C.A., HERBERMAN, R.B., WILLIAMS, B.R.G., BORDEN, E.C., BORDENS, R., WALTER, M.R., NAGABHUSHAN, T.L., TROTTA, P.P., PESTKA, S. Biological properties of recombinant α -interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. **Cancer Res.**, Birmingham, v.58, p.2489-2499, 1998
- PIEHLER, J., SCHREIBER, G. Biophysical analysis of the interaction of human Ifnar2 expressed in *E. coli* with IFN- α 2. **J. Mol. Biol.**, Kent, v.289, p.57-67, 1999.
- PLATANIAS, L.C., UDDIN, S., COLAMONICI, O.R. Tyrosine phosphorylation of the α and β subunits of the type I Interferon receptor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.269, p.17761-17764, 1994.
- RABINOWITZ, J., PETROS, W.P., STUART, A.R., PETERS, W.P. Characterization of endogenous cytokine concentration after high dose chemotherapy with autologous bone marrow support. **Blood**, New York, v.81, p.2452-2459, 1993.
- RAHMAN, M.A., BROTH, N., WEISSBACH, H. High level expression and purification of peptide methionine sulfoxide reductase in *Escherichia coli*. **Cell. Mol. Biol.**, Oxford, v.38, p.529-542, 1992
- REYES, V.E., KLIMPEL, G.R. Interferon alpha/beta synthesis during acute graft-versus-host disease. **Transplantation**, Baltimore, v.43, p.412-416, 1987.
- ROISMAN, L.C., PIEHLER, J., TROSSET, J-Y., SCHERGA, H.A., SCHREIBER, G. Structure of the interferon-receptor complex determined by distance constraints from double-mutant cycles and flexible docking. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.98, p.13231-13236, 2001.
- ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunol Today**, Amsterdam, v.18, p.263-?, 1997.
- RONNBLOM, L.E., ALM, G., OBERG, K.E. Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. **Ann Intern Med.**, Philadelphia, v.115, p.178-183, 1991.

- ROSNER, B. **Fundamentals of biostatistics**. 2ed. Boston: PWS, 1986, p.579.
- RUDOLPH R, LILIE H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. **FASEB J**, Bethesda, v.10, p.49-56, 1996.
- SAMUEL, C.E. Antiviral actions of Interferons. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.14, p.778-809, 2000.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Plasmid vectors. In: SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p.1-140.
- SCHATTNER, A., DUGGAN, D., NAPARSTEK, Y., SCHWARTZ, R.S. Effects of interferon-alpha on the expression of a lupus idotype in normal humans. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, Orland, v.38, p.327-36, 1986.
- SCHMIDT, M., BUCHNER, J., TODD, M.T., LORIMER, G.H., VIITANEN, P.V. On the role of groES in the chaperonin-assisted folding reaction. **J. Bio. Chem.**, Baltimore, v.269, p.10304-10311, 1994.
- SERGIESCU, D. CERUTTI, I., EFTHYMIU, E., KAHAN, A., CHANY C. Adverse effects of interferon treatment on the life span of NZB mice. **Biomedicine**, Porur, v.31, p.48-51, 1979.
- SMITH, B. D., JOHNSON, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S- transferase. **Gene**, Amsterdam, v.67, p.31-40, 1988.
- SUN, W.H., PABON, C., ALSAYED, Y., HUANG, P.P., JANDESKA, S., UDDIN, S., PLATANIAS, L.C., ROSEN, S.T. Interferon- α resistance in a cutaneous T-cell lymphoma cell line is associated with lack of STAT 1 expression. **Blood**, New York, v.91, p.570-576, 1998.
- TANAKA, N., SATO, M., LAMPHIER, M.S., NOZAWA, H., ODA, E., NOGUCHI, S., SCHREIBER, R.D., TSUJIMOTO, Y., TANIGUCHI, T. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. **Genes and Cells**, v.3, p.29-37, 1998.
- TOMPKINS, W.A. Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon- α : Mechanism of action. **J. Int. Cyt. Res.**, New York, v.19, p.817-828, 1995.
- UZÉ, G., LUTFALLA, G., GRESSER, I. Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. **Cell**, Cambridge, v.60, p.225-234, 1990.

- UZÉ, G., LUTFALLA, G., MOGENSEN, K.E. Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations. **J. Int. Cyt. Res.**, New York, v.15, p.3-26, 1995.
- WALTER, M.R., WINDSSOR, W.T., NAGABHUSHAN, T.L., LUNDELL, D.J., LUNN, C.A., ZAUODNY, P.J., NARULA, S.K. Crystal structure of a complex between interferon- γ and its soluble high-affinity receptor. **Nature**, London, v.376, p.230-235, 1995.
- WEISSMAN, J.S., RYE, H.S., FENTON, W.A., BEECHEM, J.M., HORWICH, A.L. Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. **Cell**, Cambridge, v.84, p 481-490, 1996.
- WETZEL, R., PERRY, L.J., MULKERRIN, M.G., RANDALL, L.M. Unfolding and inactivation: genetic and chemical approaches to the stabilization of T4 lysozyme and human interferon gamma against irreversible thermal denaturation. In: Hook JB, Poste G, eds. **Protein design and the development of new therapeutics and vaccines**, p.79-110, 1990.
- WHITE, D. Immunosuppression. In: BROSTOFF, J., SCADDING, K.G., MALE, D., ROITT, I.M. **Clin. Immun.**, London: Gower Medical, 1991. Cap.27.
- YANO, H., IEMURA, A., HARAMAKI, M., OGASAWARA, S., TAKAYAMA, A., AKIBA, J., KOJIRO, M. Interferon alfa receptor expression and growth inhibition by interferon alfa in human liver cancer cell lines. **Hepatology**, New York, v.29, p.1706-1717, 1999.
- YOON, S., HIRATA, R.D.C., NGUYEN, N.Y., CURI, R., RUSSO, M., HIRATA, M.H. Expression and biological activity of two recombinant polypeptides related to subunit 1 of the interferon- α receptor. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.33, p.771-778, 2000.
- ZOON, K.C., BUCKLER, C.E., BRIDGEN, P.J., GURARIROTMAN, D. Production of human lymphoblastoid interferon by Namalwa cells. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.7, p.44-51, 1978.
- ZOON, K.C., SMITH, M.E., BRIDGEN, P.J., zur NEDDEN, D., ANFINSEN, C.B. Purification and partial characterization of human lymphoblastoid interferon. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.76, p.5601-5605, 1979.