

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bruna Martins Mendes Pinto Lima

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE INTERFERON ALFA 2B ATRAVÉS
DO MENSURAR DE INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS E
DOSAGEM DA 2'-5'OLIGOADENILATO SINTETASE.**

PPGVS/INCQS
FIOCRUZ
2013

Bruna Martins Mendes Pinto Lima

**AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE INTERFERON ALFA 2B ATRAVÉS DO
MENSURAR DE INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS E DOSAGEM DA 2'-
5'OLIGOADENILATO SINTETASE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Dr^a Ana Cristina Martins de Almeida
Nogueira

Dr. Wlamir Correa de Moura

Rio de Janeiro
2013

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Lima, Bruna Martins Mendes Pinto

Avaliação da potência de interferon alfa 2b através do mensurar de intermediários fosforilados e dosagem da 2'-5'oligoadenilato sintetase. / Bruna Martins Mendes Pinto Lima. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2013.

77 f. : il., tab., graf.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2011.

1. Interferon tipo 1. 2. pSTAT1. 3. 2'-5' OAS. 4. Hep2c. 5. HepG2

ASSESSING THE POTENCY OF INTERFERON ALFA 2B BASED ON THE MEASUREMENT OF PHOSPHORYLATED INTERMEDIATES AND DOSAGE OF 2'-5' OLIGOADENILATO PROTEIN.

AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA DE INTERFERON ALFA 2B ATRAVÉS DO
MENSURAR DE INTERMEDIÁRIOS FOSFORILADOS E DOSAGEM DA
2'-5'OLIGOADENILATO SINTETASE.

Bruna Martins Mendes Pinto Lima

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Dr. Fábio Coelho Amendoeira _____
(INCQS/FIOCRUZ)

Dr^a. Jurandy Susana Patricia Ocampo Lyra _____
(UNIRIO)

Dr^a. Isabella Fernandes Delgado _____
(INCQS/FIOCRUZ)

Orientadores:

Dr^a Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira _____

Dr. Wlamir Correa de Moura _____

Rio de Janeiro
2013

Dedico esta tese:

A Deus.

A minha família e amigos pelo companheirismo em todos momentos.

Ao meu esposo Pedro, pelo seu amor e incentivo aos meus estudos.

Aos meus orientadores por todo o apoio para a realização deste trabalho.

“Construí amigos, enfrentei derrotas,
Venci obstáculos, bati na porta da vida
e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la!”

(Augusto Cury)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que colaboraram de alguma forma, para que esse trabalho fosse realizado.

- A prof^a. Ana Cristina Nogueira, por ter acreditado em mim, pelos conselhos, ensinamentos, paciência, amizade e dedicação. Sem você nada disso seria possível.
- Ao prof. Wlamir Moura por me acolher em seu laboratório, me ajudando em todas as ocasiões.
- A Ivani pela acolhida e ajuda durante o tempo em que estive no laboratório.
- Ao Edson Oliveira pelo apoio, incentivo e ajuda neste trabalho.
- A minha família, meus pais Joaquim e Sandra, meu irmão Bruno, meu avô Jaime, meus sogros Fátima e Gerardo, minha cunhada Suenny e tia Lucimar, por entenderem minha ausência em vários momentos, pela torcida e apoio incondicional.
- Ao meu esposo Pedro, por entender a falta de tempo, a “bagunça”. Por me incentivar, ajudar e estar ao meu lado em todos os momentos.
- A minha amiga-irmã Michelle Salles, obrigada pelos “ombros”, pelo apoio e pelas conversas até altas horas. Sua amizade é importante demais pra mim.
- A toda a equipe do Laboratório de Fisiologia e Infecções Virais (IOC) pelo apoio, doação de reagentes, equipamentos e células HepG2.
- Ao prof. Fábio Amendoeira pela revisão dos textos.
- A toda equipe do Setor de Cultura de Células (chefiado por Anna) e de Vacinas Virais (chefiado por Jarbas) do Departamento de Imunologia do INCQS pela ajuda e apoio.
- A bolsista Nathália pela participação nesse projeto.
- A Michele Nascimento, obrigada pelo apoio, pelas conversas no corredor.
- Ao Luis e Wallace, do laboratório do TIMO (IOC) pela ajuda na parte experimental e doação de anticorpos.
- Ao Anael, do laboratório de comunicação celular (IOC) pela ajuda na parte de imunofluorescência.
- A Sinéia do Departamento de Química do INCQS pela doação de reagentes.

- Ao Octávio do Departamento de Farmacologia e Toxicologia pela disponibilização do aparelho de ELISA.

Muito obrigado.

“Se não podes entender, crê para que entendas.

A fé precede, o intelecto segue”

(Santo Agostinho)

RESUMO

O Interferon alfa 2b recombinante corresponde ao interferon (IFN) alfa que pertence a subfamília do tipo I, sendo seu uso principal no tratamento da hepatite C. Dentre os ensaios preconizados para o controle da qualidade, o ensaio de potência do INF tem por objeto constatar se essa proteína é capaz de conter a replicação viral. O INCQS realiza o controle de todos os lotes requeridos pelo Ministério da Saúde, no entanto, não há avaliação da potência deste imunobiológico, apenas a análise documental dos lotes é feita. Neste contexto, o objetivo geral do presente projeto foi desenvolver um novo ensaio biológico para determinar a potência relativa de IFNs baseado na formação de intermediários fosforilados e proteínas relacionadas com a atividade antiviral do IFN alfa. Para tal realizamos: a padronização de um ensaio antiviral em duas linhagens celulares (Hep2C e HepG2) medindo a viabilidade celular através do MTT; a avaliação tanto da DE₅₀ quanto da potência relativa nas duas linhagens e a comparação dos resultados obtidos; a otimização de um ensaio de potência mensurando o STAT1 fosforilado por citometria de fluxo utilizando a preparação da referência internacional do IFN; a comparação dos resultados obtidos com as linhagens Hep2C e HepG2 nos ensaios com pSTAT1; a comparação da metodologia utilizando o pSTAT1 com o ensaio antiviral e por fim a verificação da viabilidade de um ensaio de potência para o IFN utilizando a enzima 2'-5' OAS como desfecho. Sumariamente, as duas linhagens demonstraram boa viabilidade para uso nos ensaios antivirais, entretanto, a célula Hep2C respondeu melhor ao ensaio do pSTAT1, nas condições experimentais realizadas. A linhagem celular HepG2 apresentou resultados promissores para a utilização da 2'-5' OAS como um possível candidato para um ensaio de potência, no entanto, esses resultados precisam ser confirmados e uma curva dose-dependente ainda deve ser estabelecida.

Palavras-chave: Interferon tipo 1. pSTAT1. 2'-5' OAS. Hep2c. HepG2

ABSTRACT

Interferon alpha 2b recombinant equals interferon (IFN) alpha and belongs to INF type I subfamily. Its main use as a therapeutic is on the treatment of hepatitis C. Among the assays recommended for quality control, the potency assay is often an effort to determine whether this cytokine is able to contain viral replication. INCQS performs the control of all batches required by the Ministry of Health, however, there is no evaluation of the potency of this immunobiological drug, and just the document analysis is made. In this context, the aim of this project was to develop a new bioassay to determine the relative potency of IFNs based on the stimulation and transcription of intracellular phosphorylated intermediates and proteins related to the antiviral activity of IFN alpha. For this purpose we performed: the standardization of an antiviral assay in two cell lines (HepG2 and Hep2C) measuring cell viability by MTT, evaluating both the ED50 as the relative potency in both lineages and compared the results obtained; the optimization of a test measuring the INF's potency through phosphorylated STAT1 by flow cytometry using the international reference preparation of IFN; the comparison of the results obtained with both Hep2C and HepG2 in the pSTAT1 potency assay; the comparison of the methodology using the antiviral assay with the pSTAT1 and finally the verification of the viability of a potency assay for IFN using the enzyme 2'-5' OAS as the end point. To the point, the two lineages showed good viability in antiviral assays, but only the Hep2C lineage showed a good response for the p-STAT1 assay, under our experimental conditions. The HepG2 cells presented promising results in the use of 2'-5'OAS as a candidate of a new endpoint for an INF potency assay. The latest, however, need to be confirmed and a dose-dependent curve must still be established.

Key words: Interferon type 1. pSTAT1. 2'-5' OAS. Hep2C. HepG2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição mundial do vírus da Hepatite C, segundo dados da Organização mundial de saúde no ano de 2004.....	20
Figura 2. Esquema de tratamento com Interferon convencional ou peguilado indicado para portadores do vírus da Hepatite C, segundo protocolo e diretrizes terapêuticas recomendadas pelo Ministério da saúde.....	22
Figura 3. Sinalização de Interferon pela via JAK-STAT.....	23
Figura 4. Estrutura gênica da proteína 2´-5´OAS em humanos.....	24
Figura 5. Indução do sistema 2´-5´OAS/ RNase L.....	26
Figura 6. Gráfico de entrada de amostras de IFN para o controle de qualidade no INCQS.....	32
Figura 7. Organização da placa de 96 poços para o ensaio antiviral.....	43
Figura 8. Comparação entre a DE50 do padrão de referência internacional de IFN alfa 2b em células Hep2C e HepG2.....	50
Figura 9. Comparação entre a DE50 de amostra comercial de IFN alfa 2b em células Hep2C e HepG2.....	50
Figura 10. Comparação entre os valores de potência (%) de IFN alfa 2b em células Hep2C e HepG2.....	52
Figura 11. Comparação entre os valores de potência relativa de IFN alfa 2b em células Hep2C e HepG2.....	52
Figura 12. Comparação entre a curva-dose resposta dos dados obtidos nos ensaios antivirais.....	54
Figura 13. Indução da apoptose em células Hep2C após tratamento com diferentes doses do padrão de referência internacional de IFN alfa 2b.....	56
Figura 14. Gráfico de sobreposição original ilustrando a resposta dose-dependente de P-STAT1 após o tratamento com o padrão de referencia internacional de IFN alfa 2b em células Hep2C.....	57
Figura 15. Gráfico ilustrando a média das repostas obtidas nos ensaios de P-STAT1 em células Hep2C.....	58
Figura 16. Cinética da expressão de P-STAT1 em células HepG2.....	59
Figura 17. Indução de P-STAT1 em células HepG2 após tratamento com o padrão de referencia internacional de IFN alfa 2b.....	60
Figura 18. Comparação entre a curva dose-resposta obtida nos ensaios antivirais e na marcação de P-STAT1.....	61
Figura 19- Cinética da expressão de 2´-5´OAS em células HepG2 após tratamento com o padrão de referencia internacional de IFN alfa 2b por imunofluorescência....	63

Figura 20- Expressão de 2'-5'OAS em células HepG2 após tratamento de 24h com o padrão de referência internacional de IFN alfa 2b por imunofluorescência.....64

Figura 21. Gráfico de sobreposição original ilustrando a indução de 2'-5'OAS após o tratamento com o padrão de referencia internacional de IFN alfa 2b em células Hep2C.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição estrutural das isoformas ativas de 2'-5' OAS em humanos.....	25
Tabela 2. Porcentagem de autorizações de procedimento de alto custo/complexidade (APACs) destinadas a compra de medicamentos considerados excepcionais pelo Ministério da Saúde nos anos de 2001 a 2003.....	30
Tabela 3. Concentração celular utilizada em diferentes experimentos.....	40
Tabela 4. Valores médios de D.O obtidos nos ensaios antivirais.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

16mRNA: RNA mensageiro 16

2'-5' OAS: 2'-5' Oligoadenilato sintetase

2'PDE – 2'fosfodiesterase;

ATP: adenosina trifosfato

B: branco

BSA: albumina sérica bovina

BSS-CMF: solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio

CC: controle celular

cDNA: DNA complementar

CCID₅₀: dose viral capaz de infectar 50% das células em cultura

CEN: centrômero

CV: controle de vírus

CV%: coeficiente de variação

DE₅₀: dose de IFN alfa-2b capaz de induzir 50% de efeito inibitório da ação citopática causada pelo vírus Mengo

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DNA: ácido desoxirribonucleico

D.O: densidade óptica

dsRNA: ácido ribonucleico de fita dupla

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EMCV: vírus da encefalomiocardite murina

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

FACS: *fluorescence activated cell sorting*

FcR: Receptor Fc

FCS: *Forward Scatter*

Hep2C – linhagem celular epitelial derivada de carcinoma laríngeo humano

HepG2- linhagem celular derivada de carcinoma hepático humano

HepG2.2.15- linhagem celular derivada de carcinoma hepático humano

HIV: vírus da Imunodeficiência adquirida

HLA-DR: antígenos leucocitários humanos - DR

hOAS1: gene humano Oligoadenilato sintetase 1

hOAS2: gene humano Oligoadenilato sintetase 2

hOAS3: gene humano Oligoadenilato sintetase 3
hOASL1: gene humano Oligoadenilato sintetase L 1
hOASL2 gene humano Oligoadenilato sintetase L 1
ICAM-I: molécula-1 de adesão intercelular
Ig: Imunoglobulina
IgG: imunoglobulina G
IFN: interferon
IFN α : interferon alfa
IFNAR1: receptor 1 do interferon- α
IFNAR2: receptor 2 do interferon- α
IFNLR1: receptor 1 de IFN- λ
IFN-R receptor de IFN.
IL-10 R2: Receptor 2 de interleucina 10
INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IRF9: fator 9 de regulação do interferon
ISGF3: fator 3 de estimulação gênica do interferon
ISGs: genes induzidos por interferon
ISRE: elemento de resposta induzido pelo interferon
JAKs: janus cinases
JAK1: janus cinase 1
L929 – linhagem celular de fibroblasto de Camundongo
LABIFIV- Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia de Infecções Virais
LACENs: Laboratórios centrais de saúde pública
MEK: cinase ativada por mitógenos
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
MOI: multiplicidade de infecção
MTT: 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo
Mx: Proteína Mx
MxA: Proteína MxA
NIBSC: *National Institute of Biological Standards and Control* (Reino Unido)
OAS1: oligoadenilato sintetase 1
OAS2: oligoadenilato sintetase 2
OAS3: oligoadenilato sintetase 3

OASL: oligoadenilato sintetase L
P´tase- fosfatase
PAMP: padrão molecular associado à patógeno
PBS: tampão fosfato salino
PCR: reação de polimerase em cadeia
PEG: polietilenoglicol
PEG-IFN: Interferon peguilado
PFA: paraformaldeído
PH EUR: farmacopeia europeia
PI: Iodeto de propídio
PI3K-AKT: cinase fosfatidilinositol 3 / proteína cinase B
PKR: Proteína cinase R
PPi: Pirofosfatase
PRRs: receptor de reconhecimento de patógenos
Ps: Fosfatidilserina
pSTAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição fosforilado
Raf: proteína cinases ativada por mitógenos
RBV: Ribavirina
RNA: Ácido ribonucleico
RNase L: endonuclease latente
SFB: soro fetal bovino
SGA: sistema de gerenciamento de amostras
SNC: sobrevivência normalizada de células
SSC: *Side Scatter*
ssRNA: ácido ribonucleico de fita simples
STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição
STAT1: transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
STAT2: transdutor de sinal e ativador de transcrição 2
TEL: telômero
TYKs: cinases tirosino específicas
TYK2: cinase tirosino específica 2
UI: Unidade internacional
VHC: Vírus da Hepatite C

LISTA DE SOLUÇÕES E REAGENTES

Aminoácidos não-essenciais 0,01 mM (Sigma)
Anfotericina B 2,5 µg/ml (Sigma)
Annexin V-FITC Apoptosis detection kit (BD Pharmingen)
Anticorpo Alexa Fluor® 488 anti-pSTAT1 (BD™ Phosflow)
Anticorpo anti-OAS3 (Santa Cruz biotechnology)
Anticorpo donkey anti-goat Alexa Fluor® 488 (Invitrogen)
Azul de tripan (Sigma)
BSS- CMF: Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio
DAPI *with fluoroshield*(Sigma)
Estreptomicina (Sigma)
Glutamina (Sigma),
NaHCO₃(Sigma),
Soro fetal bovino (*Gibco® Invitrogen Corporation*)
MTT: 3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo (Sigma)
Meio de marcação (0,3% albumina sérica bovina (Sigma) + 0,02% NaN₃ em PBS)
Meio DMEM (Sigma)
PBS: tampão fosfato salino contendo NaCl 0,85%, K₂HPO₄ 0,0135% e Na₂HPO₄ dodecahidratado 0,204% em água deionizada, pH 7,4.
Penicilina G (Sigma).
PI (eBioscience)
Paraformaldeído (Sigma)
Staurosporina(Sigma)
Tripsina/EDTA (Sigma)
Triton x-100 (Bio-RAD)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 – ASPECTOS GERAIS.....	19
1.2 TRATAMENTO COM IFN NOS CASOS DE HEPATITE C.....	21
1.3 - ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DOS INTERFERONS.....	22
1.3– ATIVIDADE ANTIVIRAL	24
1.3.1- O efector antiviral 2´-5´ OAS	24
1.3.2 Vias induzíveis pelo IFN alfa	27
1.4– ATIVIDADE IMUNOMODULADORA.....	28
1.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA	29
1.5.1 Ciclo celular	29
1.5.2 Apoptose.....	29
1.6 – VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O INTERFERON	30
1.6.1 Ensaio para a avaliação da potência de IFN.	33
2. OBJETIVOS.....	36
3. JUSTIFICATIVA.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. CULTIVO CELULAR	38
4.1.1 Manutenção das linhagens	38
2.1.2 Preparo da suspensão celular.....	39
2.1.3 Determinação de concentração da suspensão celular.....	39
4.2 MANIPULAÇÃO VIRAL	40
4.2.1 Replicação do vírus Mengo	40
4.2.2 Purificação da suspensão viral.....	41
4.2.3 Determinação da dose viral capaz de infectar 50% das células em cultura (CCID ₅₀)	41
4.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE MTT	42

4.4	PREPARO DO PADRÃO E AMOSTRAS DE INTERFERON ALFA-2B	42
4.5	ENSAIO ANTIVIRAL	42
4.6	MARCAÇÃO INTRACELULAR DE STAT1 FOSFORILADO (pSTAT1)	44
4.7	ANÁLISE DE APOPTOSE POR ANEXINA V-FITC	44
4.8	IMUNOFLOURESCÊNCIA DA ENZIMA 2'-5' OLIGOADENILATO SINTETASE	45
4.9	MARCAÇÃO INTRACELULAR DA ENZIMA 2'-5' OLIGOADENILATO SINTETASE POR CITOMETRIA	46
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5.	RESULTADOS	49
5.1	DETERMINAÇÃO DA DE ₅₀	49
5.1.2	Determinação da potência de IFN alfa 2b pelo método da redução do efeito citopático viral	51
5.2	CURVA DOSE-RESPOSTA.....	53
5.2.1	Indução da apoptose por Interferon	55
5.3	INDUÇÃO DE PSTAT1 EM CÉLULAS HEP2C E HEPG2.....	57
5.4	COMPARAÇÃO ENTRE PSTAT1 E ENSAIO ANTIVIRAL.....	61
5.5	ANÁLISE DE 2'-5' OAS COMO ALTERNATIVA PARA ENSAIO DE POTÊNCIA	62
5.5.1	Imunofluorescência	62
5.5.2	Citometria de fluxo.....	65
6.	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	66
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1 – ASPECTOS GERAIS

Na década de 70, o advento da tecnologia do DNA recombinante e a tecnologia do anticorpo monoclonal impactaram fortemente na produção de proteínas e peptídeos de interesse farmacêutico. A possibilidade de introdução de genes que codificam proteínas de interesse farmacêutico em bactérias foi o início de uma nova era nas ciências biológicas. Alguns exemplos de medicamentos de uso clínico produzidos por esta tecnologia são: insulina (hormônio utilizado no tratamento da diabetes), hormônio do crescimento (utilizado no tratamento do nanismo), os interferons alfa, beta e gama (citocinas inicialmente utilizadas na terapia do câncer), eritropoetina (citocina utilizada no tratamento da anemia), entre outros (FROKJAER, 2000).

Os interferons (IFNs) são citocinas potentes que são sintetizadas por células em resposta a diversos indutores, trazendo alterações bioquímicas as quais induzem um estado antiviral nas células de mesma espécie. Além da sua ação antiviral, os IFNs podem atuar na modulação do sistema imune, na diferenciação e crescimento celular (SARKAR, 2003).

A designação coletiva dos interferons é baseada em sua capacidade de interferir na replicação viral de uma gama de vírus atuantes em mamíferos (STEWART, 1979). Há três subfamílias de interferons descritas, sendo denominadas como Interferon tipo I, II e III. O interferon de interesse nesse projeto pertence a subfamília do Tipo I sendo o IFN leucocitário, uma mistura de 12 proteínas distintas, porém estruturalmente relacionadas, conhecidas como “subtipos IFN- α ”, contendo 165 – 166 aminoácidos (NAGATA *et al.*, 1980; revisado por MEAGER, 1998 a,b; ALLEN e DIAZ, 1996).

O Interferon alfa 2b é utilizado como terapêutico no tratamento de uma série de enfermidades, como a papilomatose respiratória recorrente (DEUÑAS *et al.*, 1997), condiloma acuminado (DÍAZ DE LA ROCHA, 1997), hepatite B crônica (FROUTAN PISHBIJARY *et al.*, 2001), leucemia mielóide crônica (SVARCH *et al.*, 1996), tricoleucemia (QUESADA *et al.*, 1986), sendo que o principal uso clínico dos Interferons recombinantes é no tratamento da hepatite C.

Estima-se que existam, no mundo, mais de 170 milhões de pessoas contaminadas pelo vírus da hepatite C (VHC) na forma crônica da doença (WHO,

2012). No Brasil, segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde através do Boletim epidemiológico de Hepatites Virais (2011), foram confirmados 69.952 casos de Hepatite C, entre os anos de 1999 e 2010, sendo 90% desses casos concentrados nas regiões sudeste e sul do país, como observado no mapa disponibilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil está entre os países com uma alta taxa de prevalência da doença, 2,5 a 10% de casos. (figura 1). A hepatite C é considerada a principal causa de doença hepática bem como de transplante hepático nos Estados Unidos, podendo evoluir para cirrose (20% a 40% dos casos) e carcinoma hepatocelular (2,5% dos casos) (LAUER, 2001).

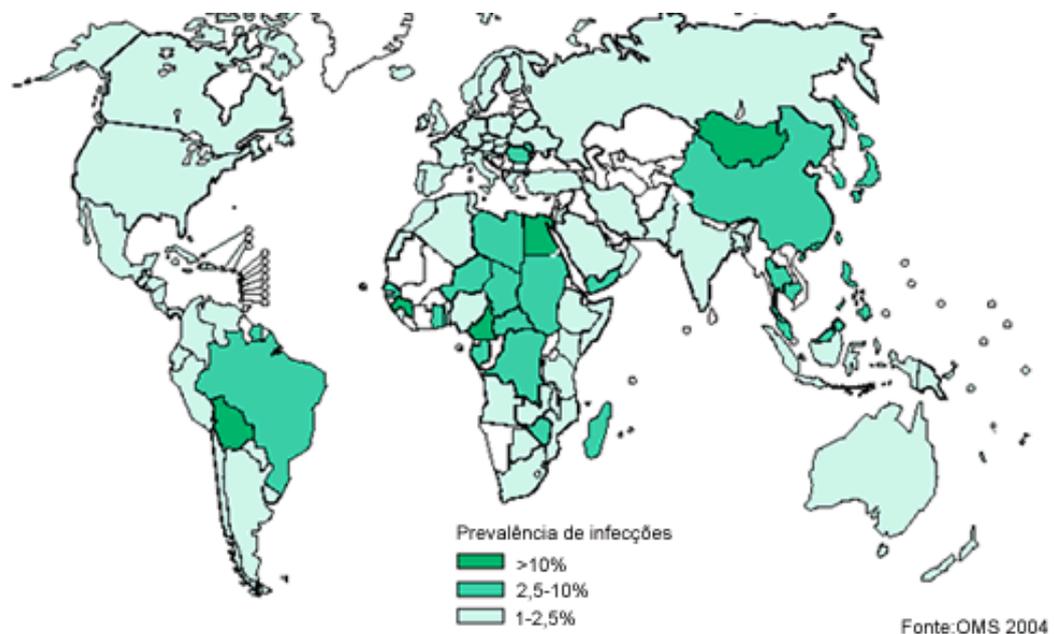


Figura 1- Distribuição mundial do vírus da Hepatite C, segundo dados da Organização mundial de saúde no ano de 2004.

As pesquisas sobre tratamentos para a hepatite C aumentaram quando, em 1989, seu vírus foi isolado e identificado como o principal responsável pelas hepatites pós-transfusionais não-A e não-B (CHOO et al, 1989). Em 1997, um consenso americano *National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel Statement*, estabeleceu o uso do interferon alfa para tratamento da hepatite C crônica, sendo o sucesso da terapia relacionado a resposta sustentada, compreendida como a ausência de RNA viral após seis meses de

tratamento. (KJAERGARD *et al.*, 2001; KJAERGARD *et al.*, 2002; MYERS *et al.*, 2002; POYNARD *et al.*, 1996).

1.2 TRATAMENTO COM IFN NOS CASOS DE HEPATITE C.

Atualmente estão disponíveis no Brasil o IFN convencional e a ribavirina (RBV), ambos de produção nacional, e o interferon peguilado (PEG-IFN) alfa-2a e alfa-2b, produzidos por diferentes companhias farmacêuticas. O Interferon peguilado (PEG-IFN) se diferencia do Interferon convencional devido a adição de uma molécula de polietilenoglicol (PEG) em sua estrutura (BRUNO *et al.*, 2012), o que dificulta sua depuração renal, aumentando a meia-vida sérica do biofármaco no organismo.

Segundo protocolo e diretrizes terapêuticas recomendadas pelo Ministério da saúde (2011), pacientes portadores de hepatite C aguda, devem ser tratados através de uma monoterapia com IFN convencional em dose diária de indução (alfa-2a na dose de 6000000 UI/ml ou alfa-2b na dose de 5000000 UI/ml), por via subcutânea ou IFN convencional alfa-2a ou 2b, 3000000 UI/ml associado a Ribavirina por via oral no caso de pacientes com maior intolerância ou má adesão a doses elevadas de IFN.

O tratamento adotado para os casos de Hepatite crônica varia de acordo com o genótipo viral envolvido na doença. Nos casos de pacientes portadores do genótipo 1 é indicado o tratamento com a associação de PEG-IFN + RBV. Pacientes com genótipo 2 ou 3 de hepatite C crônica tem como esquema de tratamento recomendado, na inexistência de fatores preditores de baixa resposta viral sustentada (RVS), como manifestações clínicas de cirrose hepática e alta carga viral, a associação de IFN convencional e RBV, no caso da existência de fatores que levam a uma baixa RVS, a associação de PEG-IFN + RBV é o mais indicado. O esquema terapêutico de tratamento dos pacientes com genótipos 4 e 5 é a associação de PEG-IFN + RBV. Em casos de co-infecção da hepatite C com outros vírus, como HIV, o PEG-IFN associado a ribavirina é o mais indicado (Figura 2).

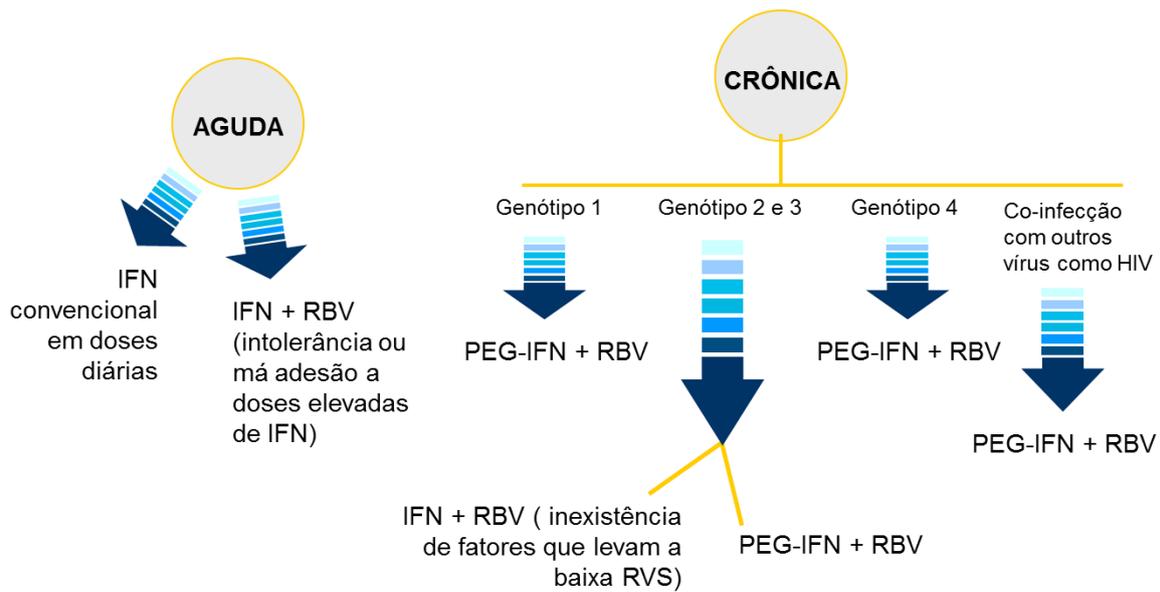
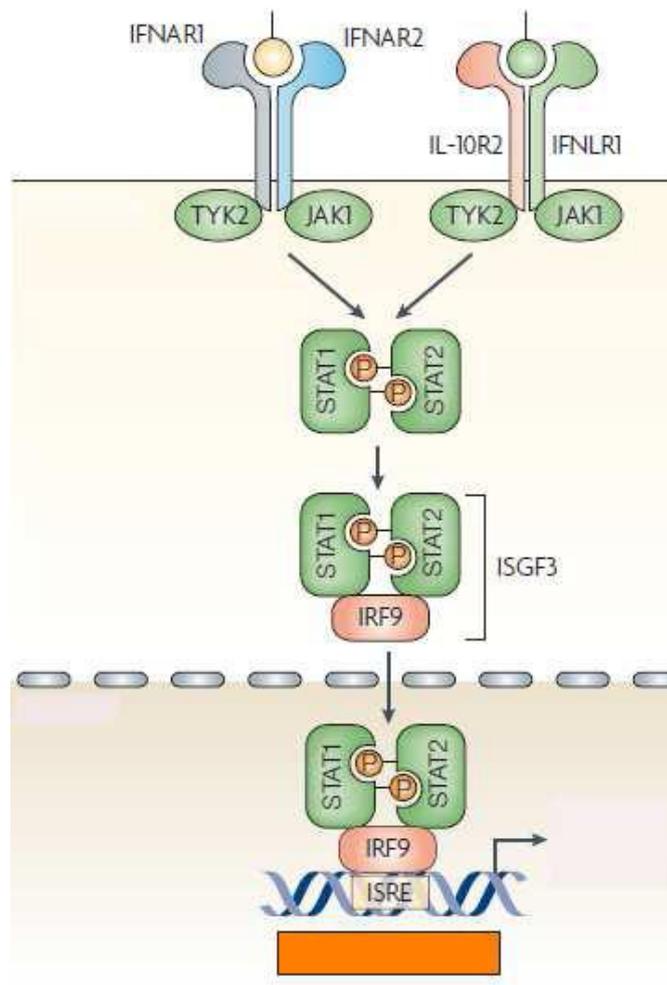


Figura 2 – Esquema de tratamento com Interferon convencional ou peguilado indicado para portadores do vírus da Hepatite C de acordo com a fase da doença (aguda ou crônica), segundo protocolo e diretrizes terapêuticas recomendadas pelo Ministério da saúde.

1.3 - ATIVIDADE BIOLÓGICA E MECANISMO DE AÇÃO DOS INTERFERONS

A resposta biológica ao interferon é iniciada através da ligação específica desta proteína com receptores de superfície celular e subsequente ativação de uma via de transdução de sinal citoplasmática. Este sinal resulta na transcrição de “genes induzíveis por IFN” (SEN e LENGYEL, 1992; STARK *et al.*, 1998). Atualmente a atividade antiviral é vista como apenas um dentre os vários efeitos induzidos pelo interferon. O interferon é capaz de inibir proliferação de células, regular a diferenciação celular e as atividades da função celular e modular o sistema imune. A cascata de transdução de sinal inicia-se pelos elementos citoplasmáticos conhecidos como janus cinases (JAKs) e cinases tirosino-específicas (TYKs), as quais, quando ativadas fosforilam proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STATs, Figura 3). Após dimerização, as STATs translocam-se em direção ao núcleo celular onde atuarão como fatores de transcrição, levando a expressão de diversas proteínas, como: PKR, Mx e 2'-5'OAS. (IHLE e KERR, 1995; STARK *et al.* 1998).



Modificado de Sadler, A. & Willians, B. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature reviews – Immunology*. (8): 559-568 (2008).

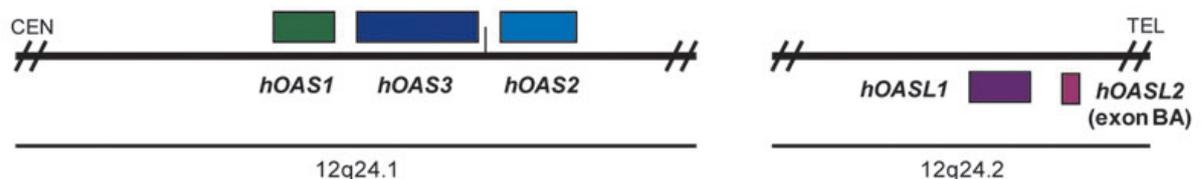
Figura 3- Sinalização através dos receptores de IFN. Após a interação do IFN tipo I com seu receptor formado por duas cadeias protéicas (IFNAR1-IFNAR2), proteínas quinases (TYK2 e JAK1) pré-ancoradas às porções citoplasmáticas do receptor fosforilam o próprio receptor que desencadeia o recrutamento e a ativação de STATs. Quando ativadas, as STATs se organizam em heterodímeros de STAT1-STAT2 permitindo desta forma a interação com o fator 9 de regulação do IFN (IRF9). O complexo resultante formado (fator 3 de estimulação gênica do IFN, ISGF3) é translocado ao núcleo e interage com o elemento de resposta ao IFN (ISRE) induzindo a transcrição de diversos genes induzíveis por IFN (ISGs) e conseqüentemente leva a expressão de proteínas efetoras antivirais que conferem proteção contra infecção. IFN tipo III interage com seu receptor também formado por duas cadeias protéicas (IL-10R2-IFNLR1) e compartilha da mesma via de transdução dos IFN tipo I para a expressão de proteínas efetoras antivirais.

1.3 – ATIVIDADE ANTIVIRAL

Foram identificadas várias proteínas com papel importante na supressão da propagação viral, entre elas, a 2'-5' Oligoadenilato sintetase (2'-5' OAS) uma proteína induzida por interferon, que catalisa a formação de um oligonucleotídeo incomum, ppp (A2'p)nA (2-5A), necessário para ativar uma endonuclease latente (RNase L), a qual degrada RNAs mensageiros virais (LENGYEL, 1982; SAMUEL, 1987; STAEHELI, 1990) necessários para a replicação citoplasmática de pequenos vírus de RNA (Picornaviridae), tais como o vírus da encefalomiocardite murina (EMCV) e o vírus MENGO (RICE *et al.*, 1985). Além da 2'-5' OAS, outras proteínas efetoras antivirais são também induzidas ao final da cascata de IFN, tais como Mx, PKR, entre outras. (STEVENSON *et al.*, 2011; STARK *et al.*, 1998). Destarte, estas proteínas podem ser induzidas diferencialmente de acordo com tipo de célula estimulada pelo IFN.

1.3.1- O efetor antiviral 2'-5' OAS

Dentre as várias proteínas identificadas com papel importante na atividade antiviral induzida pelo Interferon, a 2'-5' OAS faz parte de uma família multigênica que compreende 4 genes em humanos: OAS1, OAS2, OAS3 e OASL (KRISTIANSEN *et al.*, 2011). Esses genes são localizados no cromossomo 12, nas regiões 12q24.1 e 12q24.2. (HOVNANIAN *et al.*, 1998) e se distinguem quanto a sua estrutura e proteínas produzidas (Figura 4).



Retirado Kristiansen *et al.* The Oligoadenilato Syntethase Family: An ancient protein family with multiple antiviral activities. *Journal of interferon e cytokine research Immunology*. Volume 31, n1 (2011).

Figura 4 – Estrutura gênica da proteína 2'-5' OAS em humanos. Cada quadrado representa a unidade basal dessa proteína, dividida em 5 éxons, transcritos na direção Centrômero (CEN) – Telômero (TEL).

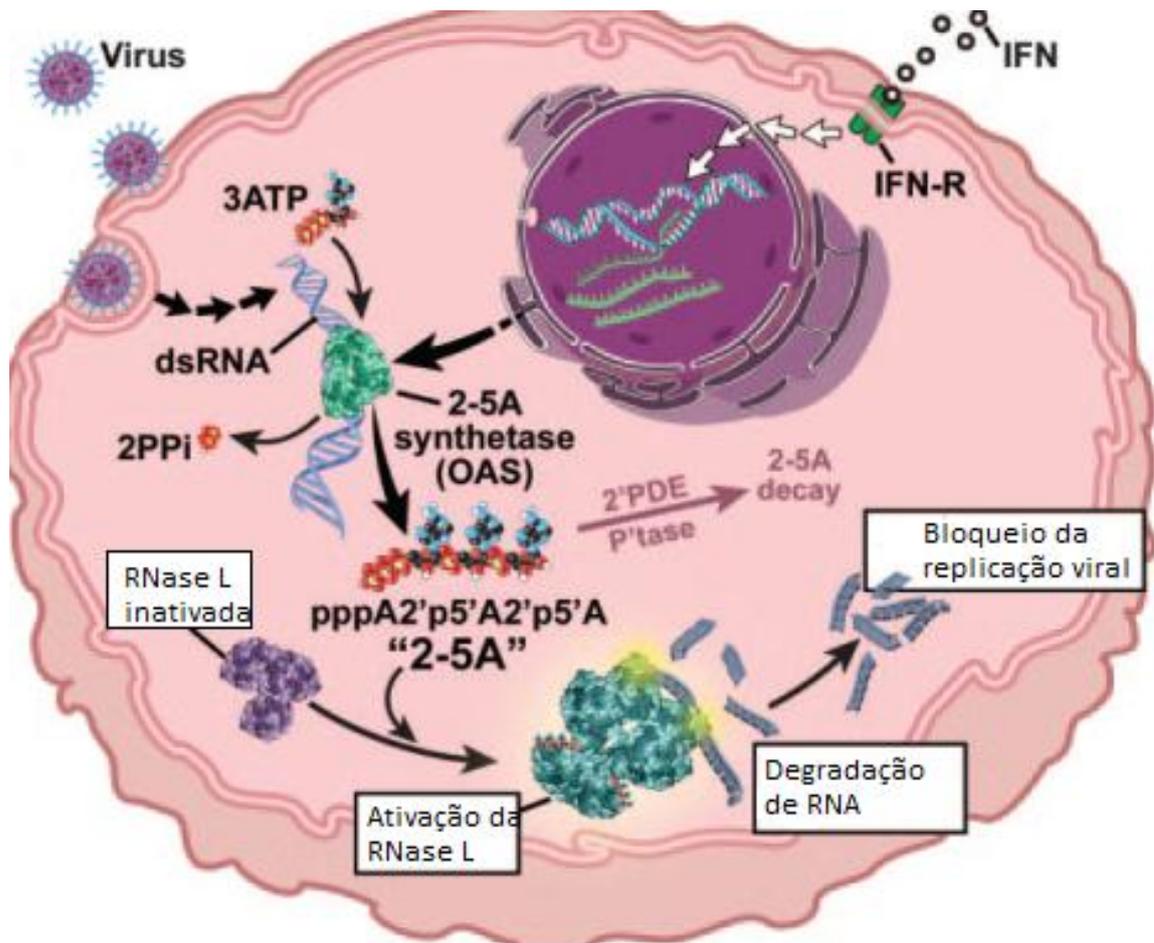
Em humanos, há três genes funcionais (OAS1, OAS2 e OAS3) que se diferenciam em 8 a 10 isoformas e um gene não funcional (OASL) incapaz de sintetizar 2'-5' OAS (Tabela 1). Devido a suas diferentes isoformas, essas proteínas podem ser ativadas por diferentes dsRNA virais e ocupar locais distintos na célula (SILVERMAN, 2007).

Tabela 1 - Descrição estrutural das isoformas ativas humanas da 2-5 OAS.

Proteína	Estrutura	Domínios catalíticos
OAS1	Tetrâmero	Um
OAS2	Dímero	Dois
OAS3	Monômero	Um

Modificado de Silverman. Viral encounters with 2'-5'Oligoadenylate Synthetase and RNase L during Interferon antiviral response. *Journal of Immunology*, p 17210- 12729, 2007.

Quanto à principal via de ação antiviral desta enzima, foi descrito que nas células infectadas e em células vizinhas após a ativação ocorrida pela ligação do IFN alfa 2b com seu receptor é gerada uma cascata que culmina na produção de diversos efetores antivirais, também denominados como receptores de reconhecimento do patógeno (PRRs), dentre estes a 2'-5' OAS (Figura 5). Com o reconhecimento de um padrão molecular associado ao patógeno (PAMP), um oligonucleotídeo é formado pela 2'-5' OAS + PAMP em presença de ATP como substrato. Esta estrutura ativa uma endoribonuclease latente (RNase L) e desta forma a degradação de proteínas virais é induzida no interior da célula. Esses PAMPS podem ser RNAs de dupla-fita virais que incluem intermediários replicativos virais (ssRNA), RNA anelado de polaridade oposta e outras estruturas em RNAs de fita simples (Silverman 2007). Mais especificamente, ao se ligarem e ativarem o PRR 2'-5'OAS presentes nas células, esse fenômeno leva a catalisação e a formação de um oligonucleotídeo incomum, ppp (A2'p)nA (2-5A), necessário para ativar a RNase L (LENGYEL, 1982; SAMUEL, 1987; STAEHELI, 1990).



Modificado de Silverman. Viral encounters with 2'-5'Oligoadenylate Synthetase and RNase L during Interferon antiviral response. *Journal of Immunology*, p 17210- 12729, 2007.

Figura 5- Indução do sistema 2'-5' OAS/ RNase L em células, através da ligação de IFN ao seu receptor e reconhecimento viral. PPi - pirofosfatase; 2'-PDE – 2'fosfodiesterase; P'tase- fosfatase e IFN-R receptor de IFN.

A atividade da oligoadenilato sintetase é significativamente induzida nos estágios agudos das infecções virais com a produção de Interferon endógeno nas células (PAWLOSTKY *et al*, 1996).

1.3.2 Vias induzíveis pelo IFN alfa

Recentemente, foi descrito na literatura que em determinados tipos celulares os IFNs seriam capazes de induzir vias de sinalização, geralmente compreendidas como vias supressoras (CHAI *et al*, 2011). Estas seriam capazes, em células L929 (células de fibroblasto murino), de interferir na fosforilação do STAT1 de forma indireta, por reduzir os níveis citosólicos de STAT2 (CHRISTIAN, 2009). Em células HepG2.2.15 foi visto que o IFN é capaz de induzir duas vias distintas de supressão, PI3K-AKT e Raf/MEK/ERK, que atuariam na regulação da expressão gênica de diferentes proteínas induzidas pelo IFN, como 2'-5' OAS, MxA e PKR. O estudo sugere que a expressão das três proteínas citadas seria regulada positivamente pela ação da via PI3K-AKT, que ao ser bloqueada levaria a diminuição nos níveis intracelulares destas proteínas. Em contrapartida, ao analisar a via MEK/ERK, foi visto que a expressão da proteína MxA é regulada negativamente quando esta via está ativada, sendo aumentada quando a via em questão é bloqueada. A expressão gênica das proteínas 2'-5' OAS e PKR não sofreria influência da via Raf/MEK/ERK. (CHAI Y, 2011).

Outros estudos sugerem que a via Raf/MEK/ERK poderia atuar regulando a expressão das ISGs, atenuar a fosforilação de STAT1 e STAT2 e inibir a expressão de receptores para IFN (ZHANG *et al*, 2011; CHRISTIAN *et al*, 2009) levando a uma supressão da resposta antiviral induzida por esta citocina.

1.4– ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

Os interferons são conhecidos pela regulação positiva (*up regulation*) de várias respostas imunes, dentre elas, o aumento da expressão de moléculas presentes na superfície celular, como por exemplo, a microglobulina- β 2, antígenos do tipo I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC de classe I) e receptores Fc (FcR) de imunoglobulinas G (IgG), envolvidas no reconhecimento imune (HERON et al., 1978; FELLOUS *et al*, 1979; HOKLAND e BERG, 1981; VOGEL *et al*, 1983; DeMAEYER e DeMAEYER-GUINARD, 1988). Tanto o IFN tipo I como o IFN tipo II, estimulam de forma variada a expressão antigênica do MHC de classe I, mas somente o IFN tipo II consegue estimular a síntese “de novo” do antígeno de MHC de classe II, HLA-DR, necessário para disparar tanto a imunidade humoral, como a imunidade mediada por células (GIBSON e KRAMER, 1989; BILIAU, 1996; DeMAEYER e DeMAEYER-GUINARD, 1988). A expressão de moléculas de adesão celular, como a molécula-1 de adesão intracelular (ICAM-1) (BOUILLON e AUDETTE, 1993; MEAGER, 1996) e outras moléculas marcadoras de superfície celular, por exemplo, a 9-27/Leu13 (DEBLANDRE *et al*, 1995; LEVY *et al*, 1998), envolvidas na regulação da resposta imune e na inflamação, são também estimuladas pelo interferon, particularmente o IFN tipo II.

Sendo o interferon uma citocina terapêutica o controle de sua potência é recomendável e qualquer proteína estimulada por esta citocina pode, teoricamente, ser uma candidata para mensurar a eficácia da mesma.

1.5 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

A atividade antiproliferativa dos IFNs em diversas células tem sido associada ao possível papel desta citocina no controle da proliferação celular (CLEMENS, 2003). Os mecanismos de ação que envolvem uma atividade antiproliferativa, podem estar relacionados a uma alteração no ciclo celular e/ou indução de apoptose.

1.5.1 Ciclo celular

O ciclo celular é um conjunto de eventos que culmina na mitose e a produção de duas células filhas (SCHAFER, 1998). Esse processo é controlado por mecanismos diferentes, buscando uma correta divisão celular. (VERMELUEN et al, 2003). A divisão em células somáticas consiste em dois processos consecutivos: Interfase (dividida em 3 estágios G_1 , S e G_2) e fase M (dividida em 4 estágios: prófase, metáfase, anáfase e telófase). As fases G_1 e G_2 funcionam como uma espécie de lacuna entre as fases de síntese de DNA e a mitose. Em G_1 as células se preparam para que ocorra a síntese de DNA ao entrarem na fase S, após o processo de síntese do material genético, as células ingressam na fase G_2 onde se preparam para a mitose.(SCHAFER,1998). Células em G_1 podem entrar em uma fase conhecida como G_0 onde a maior parte das células que não estão em processo de crescimento e proliferação celular se encontram (VERMEULEN et al, 2003).

1.5.2 Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada, onde não ocorre extravasamento de material citoplasmático da célula, portanto não gerando um processo inflamatório. Destarte, este processo também chamado de morte silenciosa é essencial para a manutenção da homeostase no organismo (BELMOKTAR et al, 2001). Diversos estudos mostram que o IFN alfa é capaz de induzir a morte celular por esse mecanismo. (PANARETAKIS et al, 2008; CHAWLA-SARKAR et al, 2003). Durante o processo de apoptose ocorrem diversas alterações na morfologia da célula, entre elas a translocação da fosfatidilserina (PS), uma proteína localizada na parte interna da membrana citoplasmática, para a parte externa da membrana citoplasmática que, por sua vez, se mantém intacta nas fases iniciais da apoptose. Ao ser exposta a PS é capaz de se ligar a Anexina V em uma reação

cálcio dependente, o que possibilita sua quantificação por citometria de fluxo (VERMES et al, 1995).

1.6 – VIGILÂNCIA SANITÁRIA E O INTERFERON

A terapia com Interferon recombinante humano se enquadra na melhoria das condições de vida, em primeira linha, de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C. Esta terapia tem sido de fato, mundialmente utilizada e previne o desenvolvimento de complicações decorrentes da hepatite C crônica, aumentando e melhorando a sobrevida dos pacientes.

No Brasil, o uso do interferon e do interferon peguilado é coberto pelo Programa de Medicamentos de Alto Custo de uso Excepcional do Ministério da Saúde. De acordo com o relatório de avaliação de programa: Ação assistência para aquisição e distribuição de medicamentos excepcionais (TRIBUNAL DE CONTAS DA UNIÃO, 2004), os maiores gastos do Ministério da Saúde com medicamentos excepcionais, entre os anos de 2001 a 2003, estão concentrados em tratamentos de renais crônicos, transplantados, doença de Gaucher e hepatites B e C, totalizando 57,14% do orçamento destinado as autorizações de procedimento de alto custo/complexidade – APACs (Tabela 2). O alto gasto com esses medicamentos não se deve apenas ao seu custo elevado, mas pelo amplo número de doentes e pela necessidade de um longo tempo de tratamento para sobrevivência desses pacientes.

Tabela 2 – Porcentagem de autorizações de procedimento de alto custo/complexidade (APACs) destinadas a compra de medicamentos considerados excepcionais pelo Ministério da Saúde nos anos de 2001 a 2003.

Medicamentos excepcionais	APACs (%)
Interferon alfa	8,82
Interferon beta	10,73
Interferon alfa peguilado	7,36
Ciclosporina	9,15
Imiglucerase	9,09
Eritropoetina	11,99

Modificado de Brasil. Tribunal de Contas da União. Relatório de avaliação de programa : Ação Assistência para Aquisição e Distribuição de Medicamentos Excepcionais / Tribunal de Contas da União, 2004.

Uma vez que o interferon vem sendo amplamente utilizado na clínica, este biofármaco torna-se um item sob vigilância sanitária.

A vigilância sanitária articula vários níveis de prevenção bem como de ações terapêuticas, enfatizando o desenvolvimento de um amplo espectro de atividades que incluem questões relativas à melhoria de condições de vida e saúde para população.

No Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é realizado o controle da qualidade de medicamentos, alimentos, saneantes, imunobiológicos e outros. De fato a legislação estabelece que a análise fiscal, a análise de controle e a análise prévia de imunobiológicos devem ser realizadas em laboratórios oficiais (Brasil, 1977), portanto a análise fiscal e de controle do interferon recombinante alfa 2b deveria ser realizada no INCQS e em outros laboratórios relacionados a vigilância sanitária (i.e LACENS). Além disso, a portaria conjunta nº 92 (Brasil, 2008) da Anvisa estabelece como atribuições do INCQS, a análise de imunobiológicos suspeitos de desvio de qualidade e a proposta de novas análises laboratoriais não realizadas na rotina diante de eventos adversos. Também seria uma atribuição do instituto, de acordo com a RDC nº 315 (Brasil, 2005) a análise dos três primeiros lotes produzidos pelo detentor do registro de qualquer medicamento biológico, após a aprovação de alteração do registro do mesmo, quando solicitado pela Unidade de Produtos Biológicos e Hemoterápicos (UPBIH) pertencente a ANVISA.

O interferon recombinante humano é um biofármaco que pode ser classificado dentre os imunobiológicos, assim como vacinas, soros e eritropoietina. Dentre os testes realizados, o ensaio de potência do interferon recombinante humano tem por objeto constatar se essa proteína é capaz de conter a replicação viral. Na prática o ensaio é realizado *in vitro*, em linhagens celulares, onde a atividade do interferon é avaliada através da capacidade deste de inibir a replicação viral em uma determinada cultura celular (COUNCIL OF EUROPE, 2012).

O INCQS realiza o controle de todos os lotes requeridos pelo Ministério da Saúde, através da avaliação de requisitos como aspecto, umidade residual, esterilidade, identidade da substância, PH, toxicidade inespecífica, endotoxina, potência e análise de rótulo, entre outros.

Entretanto, a avaliação da potência deste imunobiológico é realizada através da análise documental dos lotes.

A entrada de lotes para análise ocorre quase que anualmente, porém desde 2006 poucas amostras do interferon convencional foram direcionadas para a análise de controle de qualidade no Instituto (Figura 6), tendo como principal motivo a introdução do interferon peguilado no mercado, que passou a ser utilizado como primeira linha de tratamento dos genótipos 1, 2, 3 e 4 e em casos de co-infecção com outros vírus, como o HIV, reduzindo o uso do interferon convencional aos casos agudos da doença e nos tipos 2 e 3, na inexistência de fatores preditores de baixa resposta viral sustentada (RVS). Além disso, diversos pacientes conseguiram através de decisões judiciais o direito de utilizar o interferon peguilado nos casos em que o primeiro tratamento com o interferon convencional não foi capaz de reduzir os níveis virais, com base na portaria nº639 do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

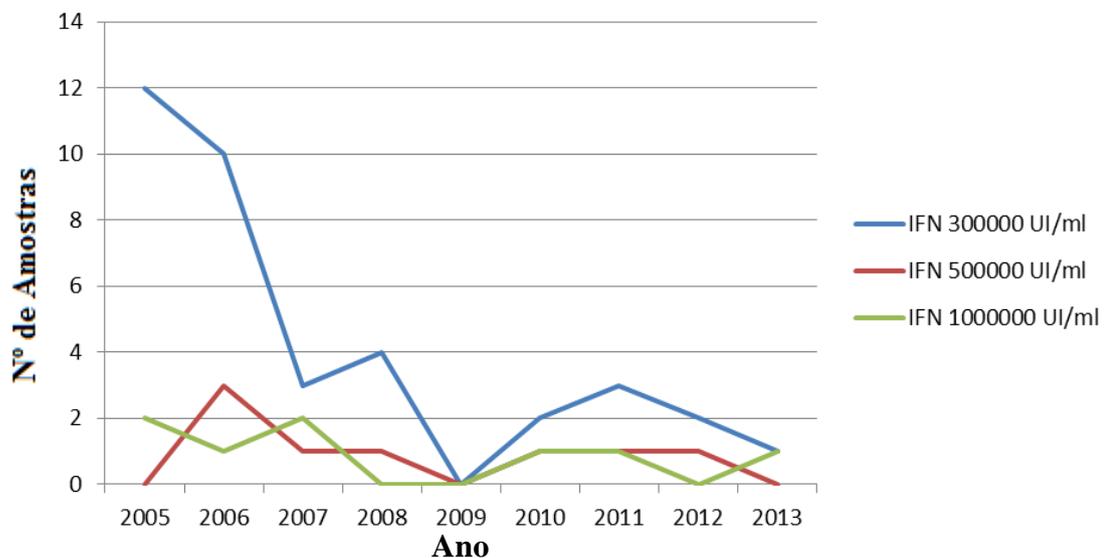


Figura 6: Gráfico de entrada de amostras para controle de qualidade no INCQS. Dados provenientes do SGA (Sistema de gerenciamento de amostras).

Apenas a análise documental da potência não é satisfatória, por se tratar de um biofármaco amplamente administrado em pacientes em todo país. Além disso, o interferon pode causar inúmeras reações adversas de pequena e grande gravidade, como: dor e eritema no local da aplicação, febre, calafrios, dor de cabeça, mialgia, fadiga, náusea, vômitos, diarreia, depressão, insuficiência renal, arritmia, hipertensão. Este fato reitera a importância do controle da qualidade deste biofármaco, dado o alto grau de risco na relação de efeito esperado e dano causado, tornando imprescindível a certeza da eficácia do medicamento antes da sua aplicação.

1.6.1 Ensaios para a avaliação da potência de IFN.

Todos os ensaios biológicos que utilizam culturas celulares são, por sua natureza, sensíveis aos tipos celulares utilizados e as condições gerais do ensaio, podendo sofrer diversas variações. Os ensaios biológicos de avaliação do IFN necessitam de um padrão de referência para atuar como controle em relação as amostras analisadas. Atualmente, a maioria dos ensaios para a avaliação da potência dos interferons são baseados em culturas celulares utilizando placas de 96 poços (MEAGER, 2002).

Os ensaios antivirais avaliam a atividade inibidora do IFN sobre a replicação viral em culturas celulares (COUNCIL OF EUROPE, 2012b), podendo ser avaliada e quantificada de maneiras distintas, como a redução da produção de partículas virais, do efeito citopático viral, da formação de placas virais, de proteínas e RNA viral, por exemplo. (GROSSBERG & SEDMAK, 1984; LEWIS, 1987; MEAGER, 1987; MEAGER, 2003). Esse tipo de ensaio requer um longo tempo experimental, além de um alto custo para sua realização (MEAGER, 2003). Atualmente, o ensaio antiviral, também conhecido como ensaio de redução do efeito citopático, é preconizado pela farmacopéia européia para a determinação da potência relativa do Interferon (COUNCIL OF EUROPE, 2012b). Podem ser utilizadas na realização desse tipo de ensaio uma grande variedade de células de mamíferos, como células de carcinoma pulmonar (A549), carcinoma hepático (HepG2), glioblastoma (2D9), carcinoma laríngeo (Hep2C), entre outras (MEAGER, 2005), associadas a utilização de um vírus capaz de produzir um efeito lítico nas mesmas quando desafiadas, como o vírus estomatite vesicular (VSV), vírus da encefalomiocardite murina (EMCV), vírus

Mengo (MV), entre outros. Dessa forma, a potência do IFN pode ser estimada pelo seu efeito protetor contra a infecção viral, comparando a proteção obtida pelo tratamento com uma amostra comercial ao padrão de referência utilizado, sendo expressa em unidades internacionais (UI).

Outro tipo de ensaio utilizado para a avaliação deste biofármaco é baseado na sua propriedade antiproliferativa em determinadas células, porém este tipo de ensaio é altamente variável por depender da cultura celular utilizada. (BORDEN *et al*, 1982). A escolha do tipo celular para este ensaio é fundamental, visto que diversas linhagens não respondem ao tratamento com IFN, se mostrando resistentes ao efeito antiproliferativo do mesmo (RIGBY *et al*, 1985). O ensaio consiste na utilização de culturas celulares em placas de 96 poços, que após a incubação com o interferon são pulsadas com [3H] timidina e contadas através da captação deste composto por cintilação líquida. A potência do interferon é estimada a partir da relação entre a linhagem tratada com a amostra de interferon em relação ao padrão (MEAGER, 2002).

Uma série de alternativas aos ensaios antivirais e antiproliferativos tem sido desenvolvidas com base na detecção da expressão de proteínas induzidas por IFN ou redução de expressão de antígenos virais em células tratadas através de imunoensaios. As proteínas de interesse expressas são detectadas e quantificadas pela ligação de anticorpos monoclonais específicos conjugados com uma enzima capaz de converter o substrato utilizado em um metabolito corado. Através de um aparelho de Espectrofotômetro é realizada a leitura de intensidade da cor obtida através de um comprimento de onda. Em outros casos, a proteína induzida é extraída a partir de células e quantificada por um imunoensaio específico. As proteínas induzidas por Interferon mais utilizadas nesses tipos de ensaio, são proteínas da superfície celular, como classe I e II MHC (HERON *et al*, 1978;. FELLOUS *et al*, 1979; BILLIAU, 1996; DEMAAYER E DEMAAYER-GUIGNARD, 1998), ICAM-1 e outras moléculas de adesão celular (BOUILLON E AUDETTE, 1993; MEAGER, 1996), além de proteínas intracelulares com a Mx ou MxA (MEAGER, 2002).

Proteínas expressas por IFN que possuem atividade biológica, como 2'-5' OAS, PKR, podem ser quantificadas através do *gene report assay*. Através da utilização de um plasmídeo com uma sequência de DNA de interesse, contendo genes promotores induzidos por Interferon acoplados a enzimas, como a luciferase é

possível transfectar linhagens celulares e verificar a expressão de uma proteína através da bioluminescência utilizando aparelho específico.

Uma alternativa a esses ensaios seria a quantificação da proteína pSTAT1 por citometria de fluxo, desenvolvido por nosso grupo de trabalho (Oliveira et al, 2012).

Recentemente, foi descrito por Moore e colaboradores (2009), um ensaio baseado na quantificação da expressão de um gene para detecção de anticorpos neutralizantes, utilizando a PCR ou a técnica do *Branched DNA*, capaz de quantificar a expressão gênica do *16mRNA* de forma direta, sem a necessidade da extração de RNA e cDNA do material a ser utilizado. A técnica consiste na quantificação direta de RNA em células lisadas, através de etapas sequenciais de hibridização do ácido nucléico a um conjunto de extensores de captura e sondas de bloqueio que visam facilitar a amplificação de sinal. Acoplado ao *branched DNA* estão múltiplas luciferases que auxiliam na detecção do gene amplificado através do processo de bioluminescência.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente projeto é desenvolver um novo ensaio biológico para determinar a potência relativa de IFNs baseado na formação de intermediários fosforilados intracelulares e em fatores relacionados com a atividade antiviral do IFN alfa. Os objetivos específicos são:

- Padronizar o ensaio antiviral em células HepG2.
- Comparar os resultados obtidos com as linhagens Hep2C e HepG2 nos ensaios antivirais.
- Otimizar o ensaio de potência mensurando o STAT1 fosforilado por citometria de fluxo utilizando a preparação da referência internacional do IFN (NIBSC).
- Comparar os resultados obtidos com as linhagens Hep2C e HepG2 nos ensaios com pSTAT1.
- Comparar a metodologia utilizando o pSTAT1 com o ensaio antiviral.
- Verificar a viabilidade de um ensaio de potência para o Interferon detectando e quantificando a enzima 2'-5' OAS como desfecho.

3. JUSTIFICATIVA

No trabalho já desenvolvido anteriormente através de uma dissertação de mestrado “Estudo da atividade biológica do Interferon alfa-2b em células Hep2C para aplicação em ensaios de determinação de potência” (OLIVEIRA, 2010) padronizamos e descrevemos um ensaio antiviral para avaliar a potência do IFN utilizando células Hep2C e o vírus Mengo. O desenvolvimento de uma alternativa ao ensaio antiviral se justifica, pois a obtenção e manuseio do vírus Mengo não é simples, além de requerer muito tempo experimental quando comparamos com o mensurar de fatores envolvidos no sinal de transdução do IFN. A observação de um evento dose-dependente que possa ser mensurado é a base para o desenvolvimento de um ensaio biológico para a determinação de potência relativa (MEAGER, 2006). Em uma simulação de determinação de potência entre a preparação referência de IFN alfa-2b e duas preparações comerciais, observamos ainda que o método de citometria de fluxo utilizando anticorpo monoclonal anti-pSTAT1 utilizando a linhagem celular Hep2C é bastante promissor. Ensaios adicionais com um número maior de experimentos em citometria de fluxo, bem como a utilização de uma linhagem alternativa são, no entanto, necessários para gerar garantia estatística. O fato de já termos obtido bons resultados preliminares (OLIVEIRA *et al*, 2012) demonstra a total viabilidade da idéia, bem como do interesse científico nessa metodologia. Além disso, o ensaio disponível baseado na inibição do efeito citopático apresenta variabilidade considerável e alguns parâmetros subjetivos para mensurar a potência, assim como a demanda do controle do Interferon alfa 2b recombinante, justificam este trabalho dentro da Vigilância Sanitária.

A utilização de uma linhagem hepática humana (HepG2) se justifica haja vista a maior proximidade fisiológica desta célula ao alvo terapêutico do Interferon.

A escolha pela 2'-5' oligoadenilato sintetase como alvo para o desenvolvimento de um novo ensaio de potência se justifica devido a sua interação com vírus, já descrita na literatura. A 2'-5' OAS é capaz de interagir com diversos vírus, incluindo vírus da família *Picornaviridae* que incluem os vírus da Encefalomiocardite murina (EMCV) e o vírus Mengo e da família *Flaviviridae* que inclui o vírus da Hepatite C (SILVERMAN, 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CULTIVO CELULAR

4.1.1 Manutenção das linhagens

Foram utilizadas três linhagens celulares, sendo uma epitelial derivada de carcinoma laríngeo humano (Hep2C), uma linhagem celular de fibroblasto de Camundongo (L929) obtidas no Setor de Cultura de células do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e uma de carcinoma hepático humano (HepG2), doada pela Dra Simone Morais da Costa do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia de Infecções Virais (LABIFIV/IOC). Os trabalhos utilizando cultivos celulares foram desenvolvidos no LABIFIV, pertencente ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e no Laboratório de Raiva do Departamento de Imunologia do INCQS. As linhagens celulares foram cultivadas em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 , utilizando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), suplementado com glutamina 2mM, NaHCO_3 26mM, 10% de SFB e antibióticos: anfotericina B 2,5 $\mu\text{g/ml}$; estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ e penicilina G 60 $\mu\text{g/ml}$. O meio de cultura utilizado para cultivar as células L929 e HepG2 também foi suplementado com aminoácidos não-essenciais 0,01mM. As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura de células de 75 ou 175 cm^2 com volumes de meio de aproximadamente 20 e 40 ml, respectivamente.

O meio de cultura foi trocado sempre no dia após o repique e em intervalos de 48 horas. Diariamente, todas as garrafas foram inspecionadas macro e microscopicamente. As inspeções macroscópicas detectam evidências de contaminação como turbidez do meio ou presença de partículas em suspensão e as inspeções microscópicas, além de auxiliarem na detecção de possíveis contaminações, visam acompanhar o crescimento celular e a morfologia apropriada para cada linhagem. A partir de garrafas de cultivo celular contendo monocamadas celulares em confluência ou semiconfluência, foram obtidas as suspensões celulares para repique seguinte ou para os experimentos.

Toda a manipulação de células submetidas ao cultivo foi realizada em cabine de segurança biológica. Antes de cada procedimento, as cabines foram postas em funcionamento por 20 minutos para purificação da atmosfera interna e mais 20 minutos com a lâmpada de ultravioleta acionada na presença do material utilizado

na técnica. Antes da entrada de qualquer material na cabine, estes foram rinsados com gaze embebida em álcool 70%.

2.1.2 Preparo da suspensão celular

Para preparar a suspensão celular, o meio de cultura das garrafas foi descartado. A monocamada de células foi suavemente lavada por duas a três vezes com solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio (BSS-CMF) utilizando volumes de 5-15 e 10-20 ml para garrafas de 75 e 175 cm², respectivamente. A BSS-CMF foi desprezada e 3-5 e 5-7 ml de solução de tripsina 0,05% p/v acrescida de ácido etileno diaminotetraacético (EDTA) 0,02% p/v foram adicionados às garrafas de 75 e 175 cm², respectivamente. As garrafas foram incubadas com tripsina em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO₂ e a individualização das células foi acompanhada no microscópio óptico invertido. Após a tripsinização das células, foi adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SFB em igual volume ao adicionado de tripsina/EDTA na etapa anterior. O volume contido nos frascos foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta sorológica para remoção de possíveis agregados celulares. Uma pequena alíquota (20 µl de suspensão celular) foi coletada em tubo *ependorf*, sendo adicionados 180 µl de corante azul de Tripán a suspensão, para a determinação da concentração e viabilidade celular através da contagem em câmara de Neubauer.

2.1.3 Determinação de concentração da suspensão celular

Utilizando a alíquota obtida após o preparo da suspensão celular, foi estimada a concentração e o percentual de células viáveis para a realização dos ensaios biológicos e repiques celulares. O cálculo foi feito mediante contagem das células em câmara de Neubauer, previamente diluídas em azul de tripan. As células capazes de captar o corante são consideradas inviáveis devido à perda de seletividade da membrana, o que permite estimar a viabilidade através da razão entre células viáveis e não viáveis após a contagem. O fator de diluição empregado na contagem foi selecionado para que um número compreendido entre 20-50 células fosse observado por quadrante da câmara. Como o volume de cada quadrante é de 0,1 mm³, ao multiplicar a média dos quadrantes pelo fator de diluição e pelo fator da câmara de Neubauer (10⁴), estima-se a concentração (número de células/ml) da suspensão celular produzida. Durante os experimentos somente foram utilizadas

suspensões celulares com percentual de células viáveis superior a 85%. A concentração celular variou de acordo com o tipo do experimento realizado (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração celular utilizada em diferentes experimentos.

Experimento	Concentração celular (células/ml)
Citometria de fluxo	1×10^6
Apoptose celular	6×10^5
Titulação/ensaio antiviral	6×10^5
Imunofluorescência	6×10^5

4.2 MANIPULAÇÃO VIRAL

Para os experimentos foi utilizada uma cepa do vírus Mengo, pertencente ao gênero *Cardiovirus* da família *Picornaviridae*, proveniente do Instituto de Biologia Molecular da Universidade de Zurique (Suíça), que foi gentilmente cedida por Biomanguinhos (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil). Para manipulação, titulação e criopreservação do vírus foram seguidos protocolos operacionais padrão utilizados no Laboratório de Vacinas Virais do INCQS.

4.2.1 Replicação do vírus Mengo

Para a replicação do vírus Mengo, foram utilizadas duas garrafas de cultura de células de 175 cm² contendo células L929 em confluência. Uma delas foi utilizada como controle de células tendo seu meio de cultura descartado e então adicionados 100 ml de meio DMEM suplementado com 2% SFB, sendo incubada por 20h em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO₂. A garrafa destinada à replicação viral teve o seu meio de cultura descartado e foram executadas três lavagens com 10 ml de PBS. Após as lavagens, foi adicionado ao frasco 1 ml da cepa do vírus Mengo, garantindo o contato do vírus com toda a extensão da monocamada de L929. A garrafa de replicação foi mantida por uma hora em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO₂. Após este intervalo foram adicionados à garrafa de replicação, 30 ml de meio de cultura DMEM a 2% SFB sendo incubada por 20 horas nas mesmas condições anteriores. Após o período de incubação, foi certificada a integridade das células na garrafa controle e o efeito citopático viral na garrafa de replicação que foi evidenciado pela presença de

mudanças morfológicas (morfologia alargada e danos nas membranas), mortes e detritos celulares.

4.2.2 Purificação da suspensão viral

Toda a etapa de manipulação e purificação da suspensão viral foi feita em banho de gelo para evitar perdas no título viral e em cabine de segurança biológica. O meio de cultura da garrafa de replicação foi transferido para um tubo de centrifuga (tubo A) de 50 ml e centrifugado a 550 g por dez minutos sob temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para um segundo tubo de centrifuga (tubo B) de 50 ml e ambos os tubos (tubo A e B) foram mantidos no banho de gelo a 4°C. Foram adicionados 10 ml de meio de cultura DMEM 2% SFB à garrafa de replicação e com o auxílio de um removedor mecânico de monocamada celular, as células L929 infectadas e ainda aderidas foram descoladas da superfície do frasco e transferidas para o tubo A. Este tubo contendo os sedimentos e células infectadas com o vírus, após ter sido submetido a três ciclos de congelamento / descongelamento a -70°C e 37°C foi centrifugado a 550 g por dez minutos sob temperatura de 4°C e o sobrenadante foi adicionado ao tubo B. Após homogeneização do sobrenadante, este foi filtrado por sistema de filtração a vácuo em membrana de 0,10 µm. A solução resultante foi fracionada em alíquotas de 1 ml em criotubos e armazenada a -70°C.

4.2.3 Determinação da dose viral capaz de infectar 50% das células em cultura (CCID₅₀)

A determinação da CCID₅₀ foi feita em placa de 96 poços, desafiando monocamadas confluentes de células Hep2C com diluições decimais seriadas da suspensão viral obtida anteriormente em um volume final de 180 µl. As diluições foram feitas no intervalo de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ em meio de cultura DMEM 2% SFB em seis réplicas para cada concentração. Os poços periféricos foram preenchidos com 180 µl de PBS e após incubação de 18-20 horas, as placas foram observadas ao microscópio óptico invertido. Poços que exibiram efeito citopático foram definidos como positivos e a CCID₅₀ foi calculada por transformação de probitos com o auxílio do programa *Combstats*® v 5.0 (EDQM, 2013).

4.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE MTT

O preparo da solução de MTT foi feito em atmosfera estéril na concentração de 5 mg/ml em PBS. Após pesagem e solubilização, a solução foi filtrada em membrana de 0,10 µm para frasco âmbar devido a sua fotossensibilidade. Posteriormente, a mesma foi fracionada em criotubos e armazenada a -20°C conforme especificações do fabricante.

4.4 PREPARO DO PADRÃO E AMOSTRAS DE INTERFERON ALFA-2B

O padrão internacional de interferon alfa humano recombinante 2b obtido do *National Institute of Biological Standards and Control* (NIBSC, Reino Unido) contendo 70000 UI/frasco e amostras provenientes do Produtor 1 (3000000 UI/frasco) foram reconstituídos em 1 ml de água destilada estéril, diluídos a 1000 UI/ml e fracionados em alíquotas de 0,5 ml, sendo armazenados a -70°C até o momento da utilização.

4.5 ENSAIO ANTIVIRAL

Para determinar a potência dos interferons testados com relação à atividade antiviral, foi utilizado o protocolo padronizado anteriormente por nosso grupo de trabalho (OLIVEIRA, 2010) com base no ensaio para interferons descrito na Farmacopéia Européia (COUNCIL OF EUROPE, 2012).

Os testes foram realizados utilizando os 60 poços centrais de placas de 96 poços de fundo chato, onde 6×10^5 células Hep2C e HepG2 foram incubadas em um volume de 200 µl de DMEM 10% SFB por um período de 24 h em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 . Para evitar respostas desiguais e o surgimento de valores aberrantes, conforme sugerido por Meager e colaboradores (2002), os poços periféricos não foram semeados sendo somente preenchidos com 200 µl do meio de cultura utilizado. Após a incubação, o meio foi removido das placas e 200 µl das sete diluições do IFN alfa 2b (padrão e amostra) previamente preparadas em série sob fator 10 na faixa de 1000 a 0,001 UI/ml em DMEM 10% SFB, foram adicionados as placas em réplicas de três para cada concentração. Uma coluna foi destinada ao controle de células e outra para o controle de vírus, onde somente 200 µl de DMEM 10% SFB foram acrescentados. As placas foram novamente incubadas sob as mesmas condições anteriores. Após 24 h, o meio de cultura foi removido e as células foram infectadas com 180 µl da suspensão do vírus

Mengo diluído em DMEM 2% SFB, em uma multiplicidade de infecção (MOI) de aproximadamente 10, com exceção dos poços destinados ao controle celular onde apenas 180 μ l de meio DMEM 2% SFB foram acrescentados. Depois de 18-20 h de incubação com o vírus, o meio foi removido das placas e o procedimento colorimétrico utilizando MTT foi empregado.

Para o procedimento colorimétrico, um protocolo foi padronizado seguindo Mosmann (1983). Placas de 96 poços a serem coradas foram previamente lavadas com 100 μ l de PBS. Após a lavagem, foram adicionados aos poços 100 μ l de PBS e 10 μ l da solução de MTT 5 mg/ml, previamente preparada. Após 4 h de incubação das células em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 , foram adicionados 100 μ l de uma solução de HCl 0,04 N em isopropanol para solubilizar os cristais formados durante a metabolização. As placas foram homogeneizadas por três minutos em agitador de placa e as absorbâncias foram posteriormente medidas a 570 nm em espectrofotômetro (Stat Fax, Versa Max).

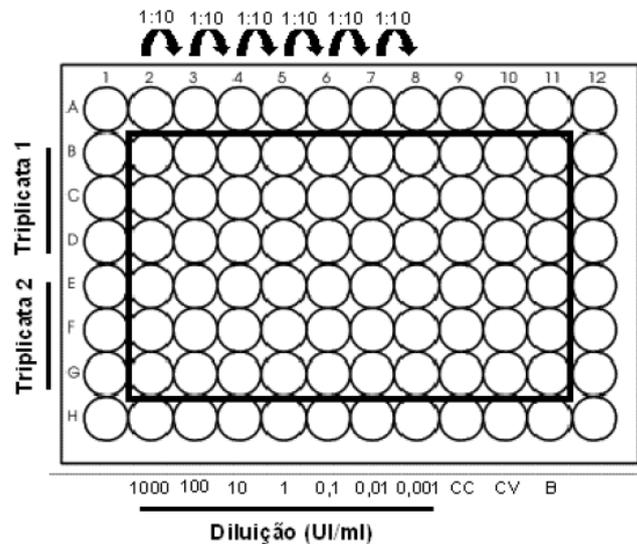


Figura 7- Organização da placa de 96 poços para o ensaio antiviral. As fileiras de 2 a 8 são usadas para o espectro de diluição do IFN alfa 2b, onde triplicata 1 (padrão) e triplicata 2 (amostra). As fileiras 8, 9 e 10 são utilizadas para o controle celular (CC), controle viral (CV) e branco (B), respectivamente. Células desafiadas com vírus Mengo e coradas com MTT.

4.6 MARCAÇÃO INTRACELULAR DE STAT1 FOSFORILADO (pSTAT1)

Para o procedimento de marcação intracelular de pSTAT1, foi utilizado o protocolo desenvolvido por nosso grupo de trabalho (OLIVEIRA, 2010). Alíquotas de 1 ml de suspensão celular de Hep2C e HepG2 a 10^6 células/ml em meio DMEM 10% SFB foram pré-incubadas por dez minutos em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 . As células foram estimuladas com IFN alfa 2b em diferentes concentrações e incubadas nas mesmas condições anteriores por 40 minutos. Após a incubação, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 1,6% por 10 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 500 g por cinco minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e 1ml de metanol a 4°C foi adicionado aos tubos que foram mantidos em banho de gelo por 10 minutos. Após a permeabilização, 3 ml de meio de marcação (0,3% albumina sérica bovina +0,02% NaN_3 em PBS) foi adicionado aos tubos que foram centrifugados nas mesmas condições descritas acima. A etapa de lavagem foi executada duas vezes. As células foram ressuspensas em 5 μl de Alexa Fluor® 488 anti-pSTAT1 para a marcação intracelular de pSTAT1 e incubadas por mais 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas com meio de marcação e analisadas em aparelho de citometria de fluxo (BD FACSCalibur).

4.7 ANÁLISE DE APOPTOSE POR ANEXINA V-FITC

Para a análise de apoptose celular foram realizados dois experimentos com tempos distintos de incubação das células com o IFN alfa 2b (4 e 24 horas), utilizando um kit comercial de Annexina V-FITC. Os ensaios foram realizados utilizando placas de 96 poços de fundo chato, onde 6×10^5 células Hep2C foram incubadas em um volume de 200 μl de DMEM 10% SFB por um período de 24h em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 . Após a incubação, o meio de cultura foi descartado e as células estimuladas com 200 μl de IFN alfa 2b nas concentrações de 1000, 100, 10 e 1 UI/ml, com exceção dos poços destinados ao controle celular, onde foi adicionado apenas 200 μl de meio DMEM a 10% SFB, sendo incubadas nas mesmas condições anteriores por 4 ou 24 horas. Os poços destinados ao controle positivo foram tratados com 200 μl de uma suspensão de *Staurosporina* em meio DMEM 10% SFB (0,05 μM), sendo incubadas nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o meio da placa foi retirado e transferido para tubos FACS. A placa foi lavada com 100 μl de PBS e as células foram

removidas utilizando 100µl de tripsina e meio DMEM 10% SFB. Após a tripsinização, a suspensão foi transferida para os respectivos tubos FACS e centrifugada a 500g por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 ml de PBS e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 ml da solução de ligação presente no kit, previamente diluída em 1:10, sendo centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µl da solução de ligação, sendo então adicionados 5 µl de Anexina V-FITC (*FITC Annexin V detection apoptosis kit I*) e incubadas por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente, com exceção dos tubos destinados ao controle celular. Após a incubação, as células foram lavadas utilizando 1 ml da solução de ligação e centrifugadas a 500 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 µl da solução de ligação. Foram adicionados 5 µl de solução de iodeto de propídio nos tubos, com exceção do controle celular para a análise em aparelho de citometria de fluxo (BD FACSCalibur).

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA DA ENZIMA 2'-5' OLIGOADENILATO SINTETASE

Para a imunofluorescência foram utilizadas placas Lab-Tek com 1×10^5 células/ml de Hep2C e HepG2 em meio DMEM 10% SFB. As placas foram incubadas em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 durante 24 horas. Após a incubação, o meio foi retirado das placas e as células tratadas com 200 µl de IFN alfa 2b 500 UI/ml, menos nos poços destinados aos controles do anticorpo secundário. Após o tratamento, as placas foram incubadas nas mesmas condições anteriores por tempos distintos (1, 2, 4 e 24 horas). Após a incubação, cada placa teve seu o meio de cultura descartado, sendo lavada duas vezes com 100 µl de PBS. Após a lavagem, as células foram fixadas com 100 µl de PFA 4% durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com 100 µl de PBS. Após esse procedimento, foram adicionados aos poços 100 µl de uma solução de 0,1% Tritonx100/BSA, durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após essa etapa, as células foram lavadas novamente com 100 µl de PBS. Após a lavagem, foi adicionado 20 µl do anticorpo primário anti-OAS3, menos nos poços destinados ao controle do anticorpo secundário, sendo incubado durante 1h em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 100 µl de PBS. Após a lavagem, foram adicionados em todos os poços

20 µl do anticorpo secundário *anti-goat Alexa 488*, sendo incubado durante 45 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram novamente lavadas com 100 µl de PBS. Posteriormente, foram adicionados aos poços, uma gota da solução *fluoroshield* com *DAPI* para a leitura no microscópio de epifluorescência, no aumento de 40x.

4.9 MARCAÇÃO INTRACELULAR DA ENZIMA 2'-5' OLIGOADENILATO SINTETASE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise de 2'-5' OAS por citometria de fluxo foi realizada utilizando uma placa de 96 poços com 1×10^6 células/ml de Hep2C e HepG2 em meio DMEM 10% SFB. As placas foram incubadas em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 durante 24 horas. Após a incubação, o meio foi retirado das placas e as células tratadas com 200 µl de IFN alfa 2b na concentração de 1000UI/ml, menos nos poços destinados aos controles celulares e do anticorpo secundário. Após a incubação, as placas tiveram seu meio descartado, sendo lavadas duas vezes com 100 µl de PBS. Após esse procedimento, as células foram removidas utilizando 100 µl de tripsina e meio DMEM 10% SFB. A suspensão celular foi transferida para os respectivos tubos FACS e fixada com 1 ml de paraformaldeído 1,6% por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas com 1 ml de PBS. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 ml de uma solução de 0,1% Triton x100/BSA, durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados aos tubos 1 ml de PBS e centrifugados a 500 g por cinco minutos. Após a centrifugação, foi realizada uma nova lavagem com PBS. O sobrenadante foi descartado e as células marcadas com 5 µl do anticorpo primário OAS3, menos nos poços destinados ao controle celular e do anticorpo secundário, sendo incubado durante 1 h em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com 1 ml de PBS e centrifugadas a 500 g por cinco minutos. Após a lavagem, foram adicionados em todos os tubos, menos no controle celular, 5 µl do anticorpo secundário *anti-goat Alexa 488*, sendo incubados durante 45 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram novamente lavadas com 1 ml de PBS e centrifugadas nas mesmas condições

anteriores. As células foram ressuspensas em 100 µl de PBS para leitura em aparelho de citometria de fluxo (BD FACSCalibur).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma estatística descritiva, onde a média e desvio padrão foram calculados no programa GraphPrism® (GraphPad Software, 2012). Além disso, quando necessário foram realizadas análises mais específicas conforme descrito abaixo.

Para comparar a resposta entre as placas de ambas as linhagens utilizadas no ensaio antiviral, os dados foram normalizados, conforme Dellgren e colaboradores (2009), utilizando os controles de células e vírus conforme a equação abaixo:

$$SNC = \left(\frac{ABS - CV}{CC - CV} \right) \times 100$$

CC = controle de célula
 CV = controle de vírus
 ABS = absorvância observada
 SNC = sobrevivência normalizada de células em relação ao controle

O modelo de linhas paralelas foi utilizado para o cálculo da concentração de IFN alfa 2b capaz de produzir 50% da inibição do efeito citopático (DE₅₀), os intervalos de confiança de 95% e coeficiente de correlação, através do programa *Combstats*® v5.0 (EDMQ,2013). Esse modelo mostra a relação entre o logaritmo da dose e a resposta, sendo representado por uma linha reta ao longo da gama de doses utilizadas, sendo a linha paralela à do padrão como referência. A linearidade pode ser verificada em ensaios nos quais pelo menos três diluições de cada preparação foram testadas. Antes do cálculo da potência relativa de cada amostra, uma análise de variância é executada, a fim de verificar se as condições necessárias para o teste são cumpridas. Quando a validade do ensaio é estabelecida, a potência de cada amostra desconhecida é calculada em relação ao padrão, podendo ser expressa como uma potência relativa ou convertida para a unidade utilizada no teste, como por exemplo, uma unidade internacional (UI/ml). Os limites de confiança também podem ser estimados a partir de cada conjunto de dados de ensaio. (COUNCIL OF EUROPE, 2012).

Os resultados obtidos foram introduzidos em gráfico de controle no programa SPC explorer RT® v.5.21 (Quality America Inc, 2010). Os gráficos de controle de valores individuais são ferramentas estatísticas usadas para avaliar a tendência central de um processo ao longo do tempo. São às vezes chamados de “gráficos de médias móveis” devido ao modo como os limites são calculados. Devem ser usados quando não é possível utilizar médias de medidas múltiplas para controlar o processo (PYZDEK, 1998). Gráficos de controle de parâmetros críticos dos materiais de referência devem também ser mantidos para monitorar o desempenho ao longo do tempo. Isto permite uma visão geral tanto da atividade das preparações de referência quanto do método. Por exemplo, pode demonstrar se há tendências ou mudanças nos atributos do material de referência, como inclinação, intercepto, *end point* 50%, o que pode indicar problemas com estabilidade do padrão de referência ou mudanças no sistema de ensaio, por exemplo, animais, células, reagentes críticos, etc (WHO, 2010).

5. RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DA DE₅₀

Os ensaios antivirais foram realizados utilizando duas linhagens celulares, Hep2C e HepG2, com o objetivo de comparar suas respostas ao ensaio proposto. Utilizando o modelo de linhas paralelas foram calculadas a potência das amostras em UI/ml e o cálculo das Doses Efetivas 50% (DE₅₀).

Para verificar a variabilidade dos ensaios e determinar a faixa de variação dos valores de DE₅₀, estes foram introduzidos em gráfico de controle. O valor médio de DE₅₀ do padrão foi de 2,48 UI/ml com um CV% de cerca de 40 % para Hep2C e 1.119 UI/ml com um CV% acima de 200% para HepG2 (Figura 08). O valor médio de DE₅₀ das amostras foi de 2,96 UI/ml com um CV% de cerca de 50% para Hep2C e de 6,32 UI/ml com um CV% acima de 200% para HepG2 (Figura 09).

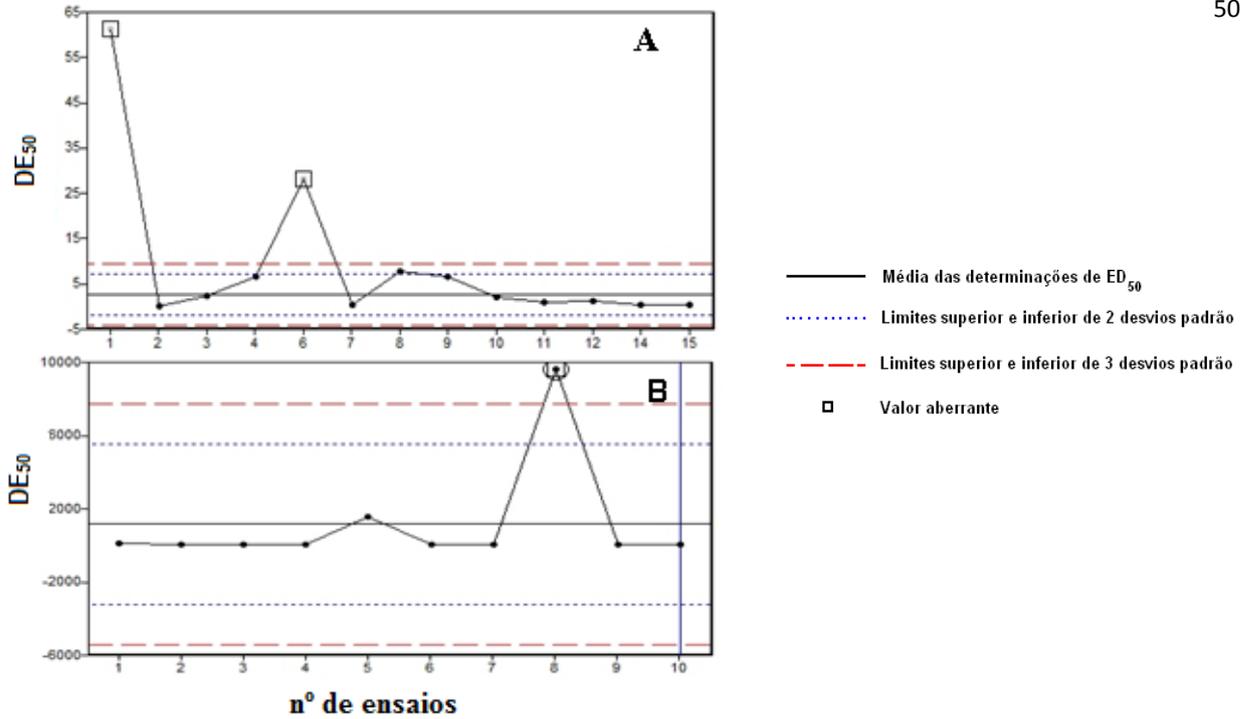


Figura 8 - Comparação entre as DE₅₀ do padrão referência internacional de IFN alfa 2b nas células Hep2C (A); Total de ensaios = 16; valores aberrantes excluídos = 1 e HepG2 (B); Total de ensaios = 13; valores aberrantes excluídos = 3. Gráficos obtidos no programa SPC explorer RT v.5.21. Cada ponto representa o resultado de um ensaio. Valores de DE₅₀ representados por unidade internacional (UI).

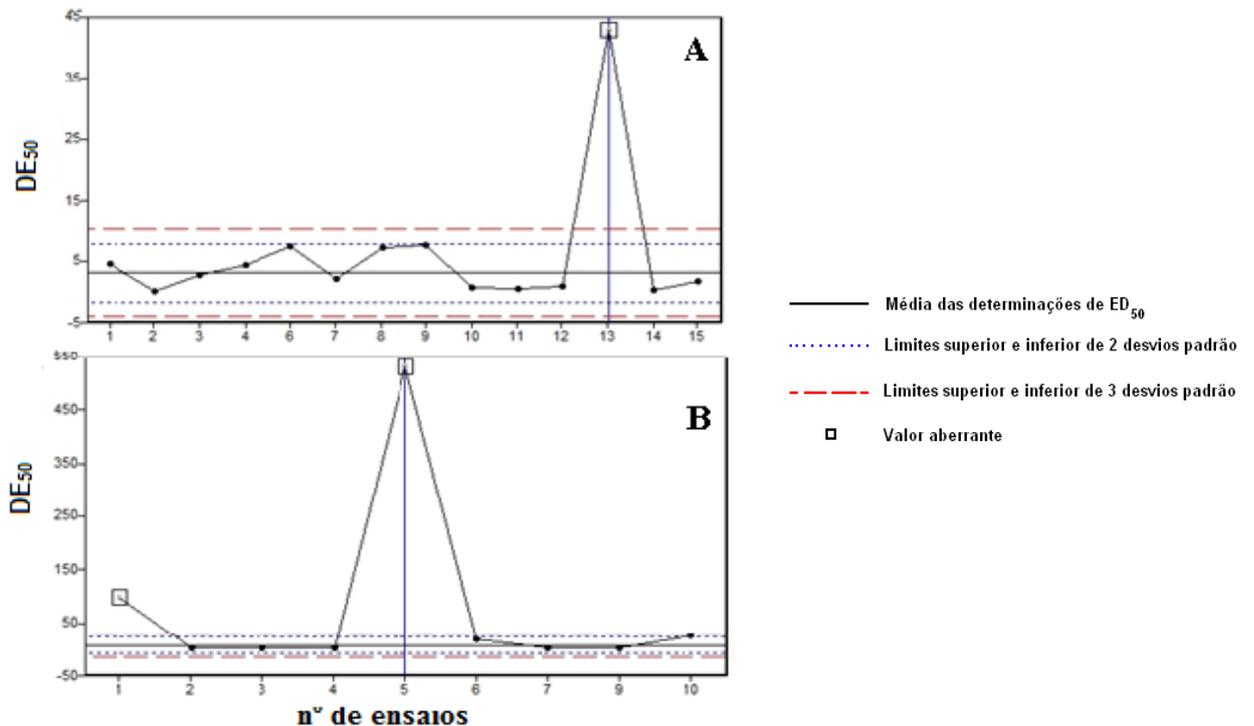


Figura 09- Comparação entre as DE₅₀ da amostra comercial de IFN alfa 2b nas células Hep2C (A); Total de ensaios = 16; valores aberrantes excluídos = 2 e HepG2 (B) Total de ensaios = 13; valores aberrantes excluídos = 4. Gráficos obtidos no programa SPC explorer RT v.5.21. Cada ponto representa o resultado de um ensaio. Valores de DE₅₀ representados por unidade internacional (UI).

5.1.2 Determinação da potência de IFN alfa 2b pelo método da redução do efeito citopático viral

A potência do IFN alfa 2b foi determinada através do método de redução do efeito citopático viral, utilizando o vírus Mengo com base no ensaio descrito pela Farmacopéia Européia (Ph. Eur.) (COUNCIL OF EUROPE, 2012). Segundo essa fonte, a potência estimada deve estar entre 80 e 125% da potência declarada pelo produtor (COUNCIL OF EUROPE, 2012).

Do total de 15 ensaios realizados com a célula Hep2C foram obtidas sete potências dentro da faixa adotada, 83,4; 119,5; 110,9; 87,2; 123,1; 113,0 e 99,0%, enquanto nas células HepG2 dos 13 ensaios foram obtidas 5 potências dentro dessa faixa, 98,9; 84,1; 117,0; 105,5 e 97,4% (Figura 10). Os limites de confiança para os resultados de potência devem ser de 95% (de acordo com Ph. Eur.). Os limites da potência relativa foram calculados com base na UI/ml declarada pelo produtor (3000000 UI/ml), com valores de 2400000 e 3750000 UI/ml. Os resultados obtidos nessa faixa de variação foram de 2502000; 3585000; 3327000; 2616000; 3693000; 3390000; 2970000 UI/ml para Hep2C e 2967000; 2523000; 3510000; 3165000; 2922000 UI/ml para HepG2 (Figura 11). A média da potência estimada do IFN alfa 2b do produtor foi de $105 \pm 13,10$ % do declarado em células Hep2C, enquanto que nos ensaios com HepG2 esse valor foi de $101 \pm 8,53$ %. Sendo assim, a variação das potências observadas nas duas linhagens foi semelhante dentro dessas condições experimentais.

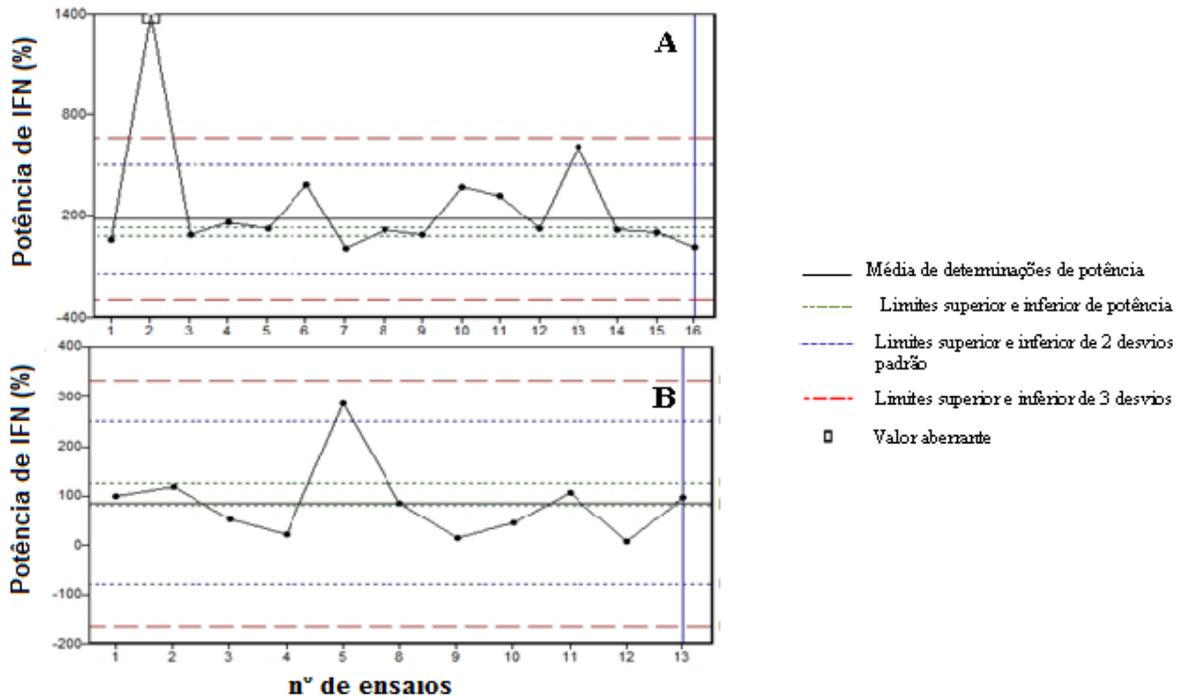


Figura 10 - Comparação entre os valores de potência (%) do IFN alfa 2b células Hep2C (A) Total de ensaios = 16; valores aberrantes excluídos = 0 e HepG2 (B) Total de ensaios = 13; valores aberrantes excluídos = 2. Gráficos obtidos no programa SPC explorer RT v.5.21. Cada ponto representa o resultado de um ensaio.

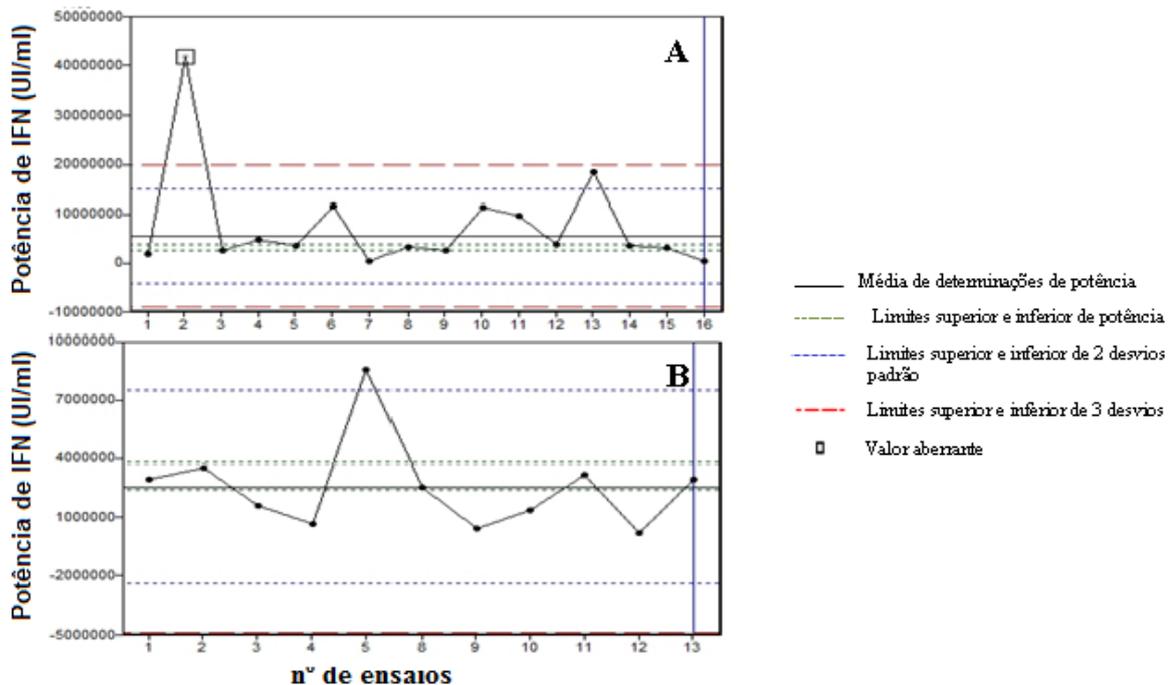


Figura 11 - Comparação entre os valores de potência relativa (UI/ml) do IFN alfa 2b células Hep2C (A) Total de ensaios = 16; valores aberrantes excluídos = 0 e HepG2 (B) Total de ensaios = 13; valores aberrantes excluídos = 2. Gráficos obtidos no programa SPC explorer RT v.5.21. Cada ponto representa o resultado de um ensaio.

5.2 CURVA DOSE-RESPOSTA

Com o objetivo de comparar as curvas-dose respostas das duas linhagens celulares, foram calculadas as médias de densidade óptica obtidas nos ensaios antivirais, sendo os valores normalizados em relação ao controle celular onde não houve tratamento com IFN alfa 2b (Tabela 4). A Figura 12 ilustra essas médias em relação ao padrão e a amostra comercial nas concentrações de 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 e 1000 UI/ml. Observou-se um aumento de cerca de 75% da proteção celular entre as doses de 0.001 e 100 UI/ml nas células Hep2C, quando tratadas com o padrão internacional de IFN alfa 2b, porém na concentração de 1000 UI/ml houve uma queda de 3% na proteção celular, em contrapartida as células HepG2 apresentaram um aumento de cerca de 55%, com um declínio na dose de 1000 UI/ml de cerca de 6% na proteção celular. Quando tratadas com a amostra comercial, as células Hep2C tiveram um aumento de 81% da proteção, com um declínio de cerca de 9% na maior dose do tratamento, enquanto as células HepG2 apresentaram um aumento de 60%, com um declínio na dose de 1000 UI/ml de cerca de 7%.

Tabela 4- Valores relativos a média das D.Os obtidas nos ensaios antivirais + desvio padrão, utilizando o padrão internacional de referência de IFN e amostra comercial em células HepG2 e Hep2C. Exibição da relação entre a dose e a sobrevivência normalizada de células (SNC).

IFN UI/ml	Padrão		Amostra	
	Hep2C	HepG2	Hep2C	HepG2
0,001	10,85 ± 8,70	15,60 ± 23,71	13,81 ± 11,86	15,28 ± 14,52
0,01	14,35 ± 9,5	16,11 ± 19,49	14,88 ± 13,38	21,71 ± 33,33
0,1	21,83 ± 17,18	24,35 ± 21,28	25,19 ± 22,15	28,74 ± 36,02
1	41,28 ± 23,17	35 ± 26,5	41,82 ± 19,86	36,80 ± 41,17
10	62,55 ± 25,16	47,33 ± 33	71,89 ± 24,61	48,57 ± 38,61
100	86,50 ± 41	70,44 ± 42,35	95 ± 31,03	75,14 ± 64,19
1000	83,67 ± 37,61	64,23 ± 45,10	85,88 ± 37,03	67,72 ± 52,31

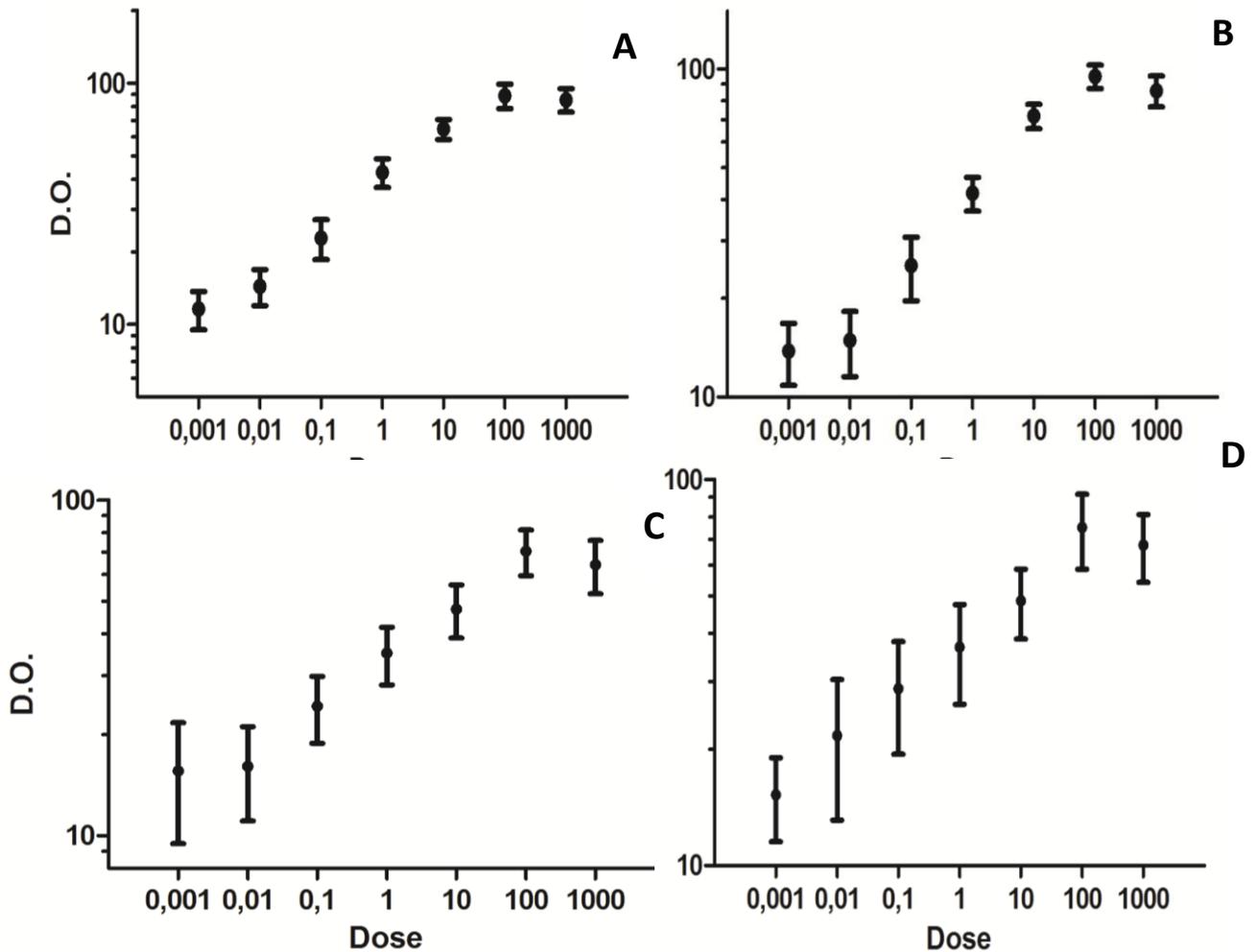


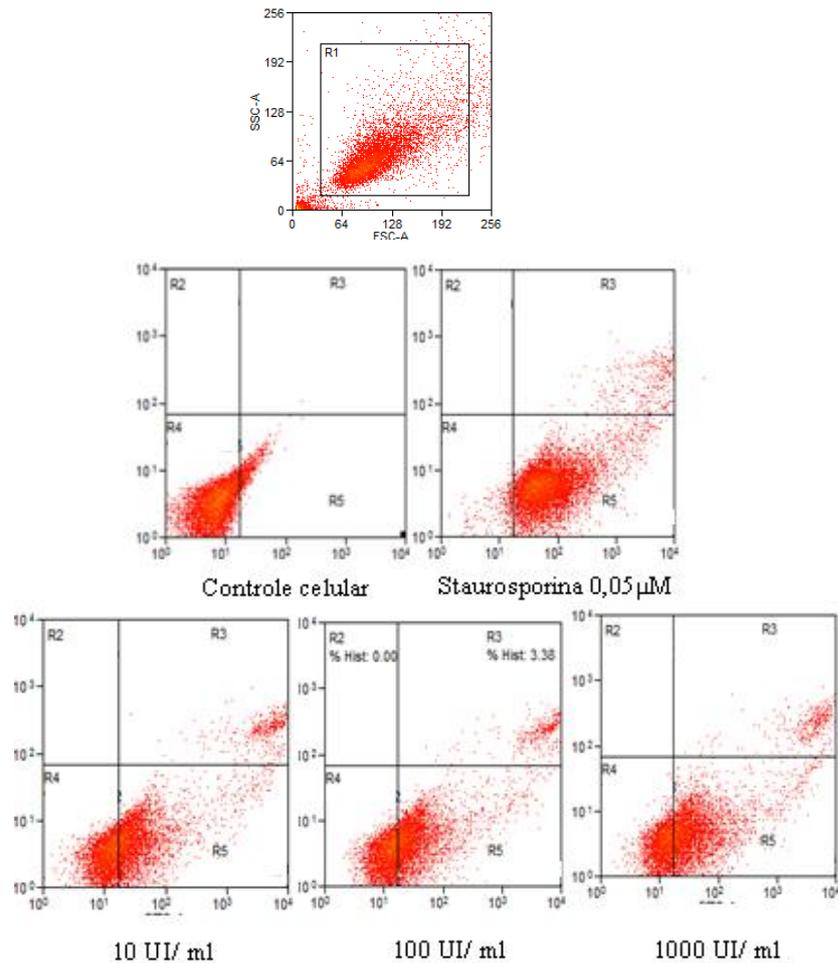
Figura 12. Dados dos ensaios antivirais, utilizando o padrão internacional de IFN alfa 2b e amostra comercial, após aplicação do modelo logístico de linhas paralelas. Exibição da relação entre a dose e a sobrevivência normalizada de células (SNC). Cada ponto representa a média de três determinações distribuídas nos ensaios. Em **A)** e **B)** são exibidos os resultados referente ao padrão de IFN e amostra comercial em Hep2C, respectivamente. **C)** e **D)** são exibidos os resultados referente ao padrão e amostra comercial em HepG2, respectivamente. Foram inseridas as médias e desvio padrão dos ensaios para cada dose de IFN (n=13 para HepG2 e n=16 para Hep2C).

Com base nesses resultados, foi desenhado um experimento para avaliação da indução de apoptose celular por IFN alfa 2b nas condições experimentais do ensaio antiviral.

5.2.1 Indução da apoptose por Interferon

Com o objetivo de verificar a indução de apoptose pelo IFN e sua possível interferência no ensaio antiviral, foi feita uma análise utilizando células Hep2C com diferentes doses do padrão internacional de referência de Interferon alfa 2b (10, 100 e 1000 UI/ml). Como controle positivo foi utilizada a *Staurosporina* em uma concentração de 0,05 μ M, um indutor clássico de apoptose celular. Foram realizados dois experimentos em tempos diferentes de 4 e 24 horas (Figura 13), onde é possível verificar a indução de apoptose nas células pelo IFN em quatro horas com um aumento de cerca de 4 vezes em vinte e quatro horas, porém, nessas condições experimentais, não foi possível estabelecer relação entre a dose de tratamento e a indução de apoptose.

A



B

Tratamento	4 horas	24 horas
	% células	Anexina ⁺
Staurosporina 0,05μM	14,97	92,43
Controle negativo	0,86	6,24
IFN 10 UI/ml	10,91	41,24
IFN 100 UI/ml	11,67	44
IFN 1000 UI/ml	12,07	51,06

Figura 13- Indução de apoptose em células Hep2C após tratamento com diferentes doses do padrão de referência de IFN alfa 2b. (A) Análise por citometria de fluxo de indução de apoptose em células Hep2C. Dot-plots originais ilustrando células PI⁺ Annexina⁻ (R2), células PI⁺ Annexina⁺ (R3), células PI⁻ Annexina⁻ (R4) e células PI⁻ Annexina⁺ (R5) após tratamento com IFN por 24 horas. Todos os eventos nos gráficos estão contidos na região 1 de células consideradas viáveis de acordo com tratamento com IFN (4 e 24 horas). Staurosporina=controle positivo; Células não tratadas = controle negativo, parâmetros morfológicos (FSC X SSC). (B) Porcentagem de células Annexina⁺ obtidas após dois tempos diferentes de incubação.

5.3 INDUÇÃO DE PSTAT1 EM CÉLULAS HEP2C E HEPG2.

Com fins de compararmos o desempenho de uma segunda linhagem celular, fisiologicamente relacionada com o alvo terapêutico do IFN, foram realizados tanto ensaios para pSTAT1 com as Hep2c e com as HepG2. A figura 14 mostra a relação entre a quantidade de pSTAT1 obtido através da estimulação das células Hep2C com o padrão de referência de IFN alfa 2b em 40 minutos. Foram realizados cinco ensaios independentes nessa linhagem celular, utilizando as doses de 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 UI/ml, os percentuais médios de pSTAT1 e o desvio padrão encontrados foram de $7,18 \pm 4,63$; $11,85 \pm 11,10$; $12,75 \pm 10,60$; $14,16 \pm 7,71$; $17,82 \pm 9,15$; $23,05 \pm 8,52$; $29,96 \pm 12,42$, respectivamente (Figura 15). Sendo assim, houve um aumento de cerca de 23% na indução de pSTAT1 nessas células após o tratamento com 1000 UI/ml.

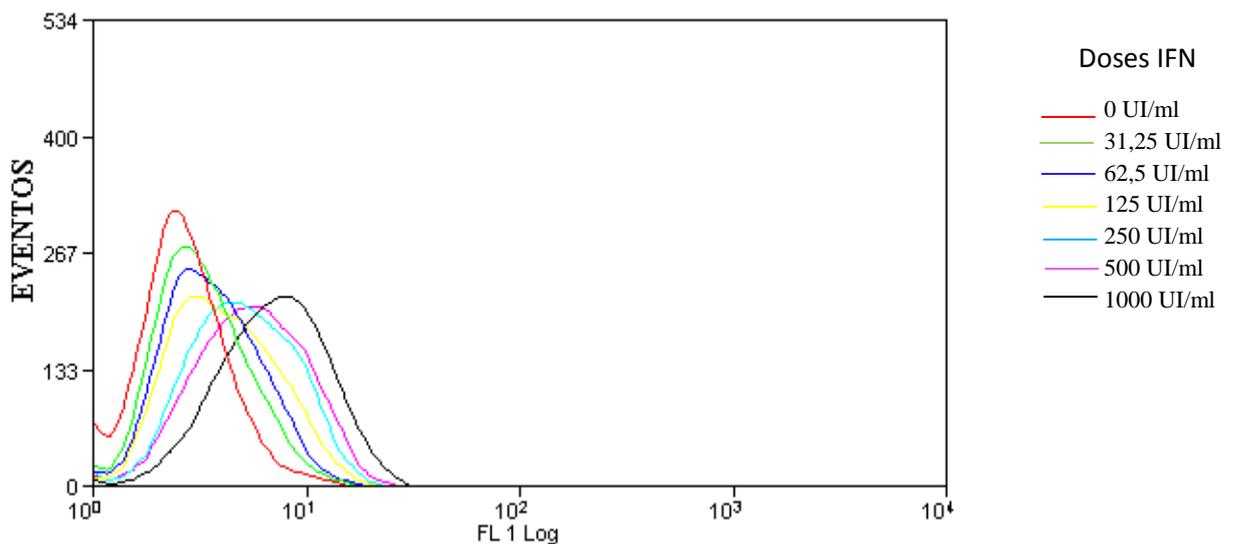


Figura 14- Gráfico de sobreposição original ilustrando a resposta dose dependente ao tratamento com o padrão de referência de IFN em células Hep2C. Cada linha representando a quantidade de eventos (eixo y) e a intensidade de fluorescência (eixo X) do anti- alexa 488 pSTAT1 em uma dose específica.

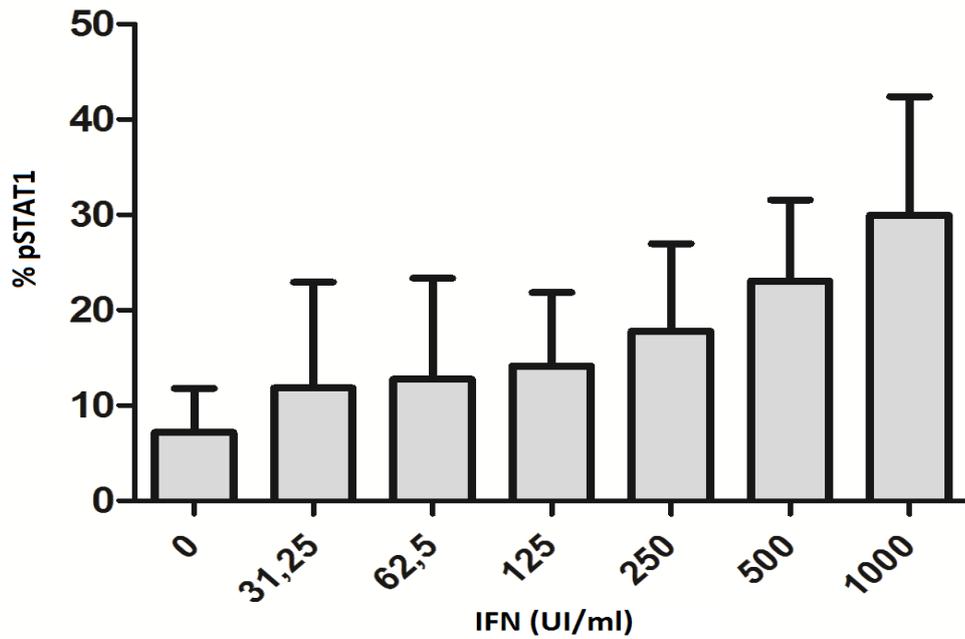


Figura 15- Gráfico ilustrando a média e o desvio padrão da resposta dose dependente ao tratamento com o padrão de referência internacional de IFN em células Hep2C obtidas em 5 ensaios diferentes.

Com o objetivo de determinar o melhor tempo de estimulação com IFN alfa 2b para a marcação intracelular de pSTAT1 em células HepG2, foi realizado uma cinética, onde as células foram tratadas com 500 UI/ml do padrão de referência de IFN em diferentes tempos 0, 15, 30, 40, 60, 90 e 120 minutos, os quais tiveram percentuais relativos de marcação de pSTAT1 de 2,54; 3,52; 5,35; 4,50; 13,96; 16,60 e 16,36%, respectivamente (Figura 16).

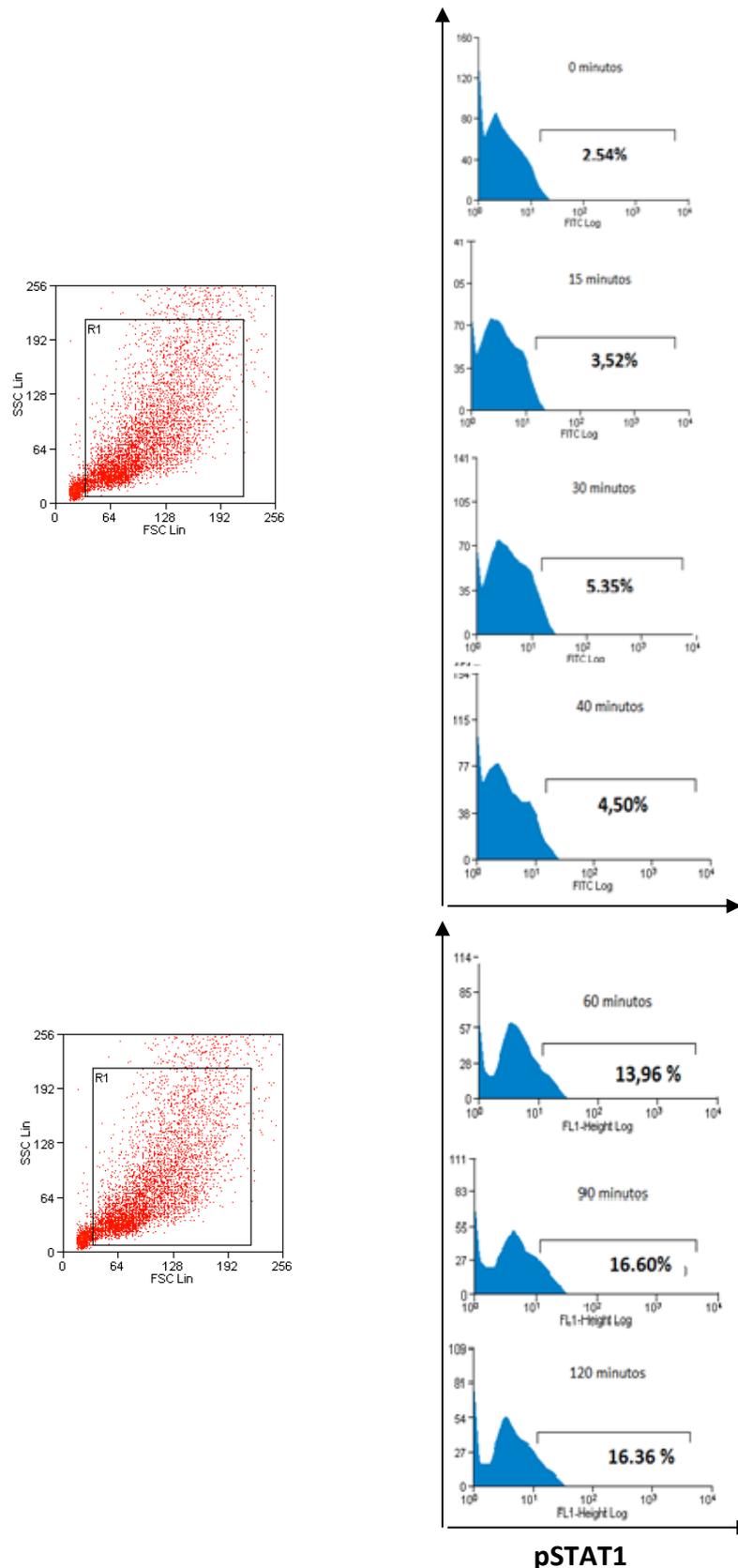


Figura 16 – Cinética de expressão de pSTAT1 em células HepG2. Todos os eventos nos gráficos estão contidos na região 1 de células consideradas viáveis de acordo com tratamento com IFN (R1), parâmetros morfológicos (FSC X SSC). Histogramas originais ilustrando o aumento da fluorescência de pSTAT1 de acordo com o tempo de estimulação utilizando o padrão de referência internacional do IFN alfa 2b.

Com base na cinética, foi escolhido o tempo de 90 minutos para a estimulação das células, dessa forma foi realizado um experimento onde se obteve para as doses de 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 UI/ml, os percentuais de 2,88; 4,43; 1,21; 2,86; 2,77; 3,06 e 4,74%, respectivamente (Figura 17). Nessas condições experimentais, não foi possível observar dose-dependência de STAT1 fosforilado em células HepG2.

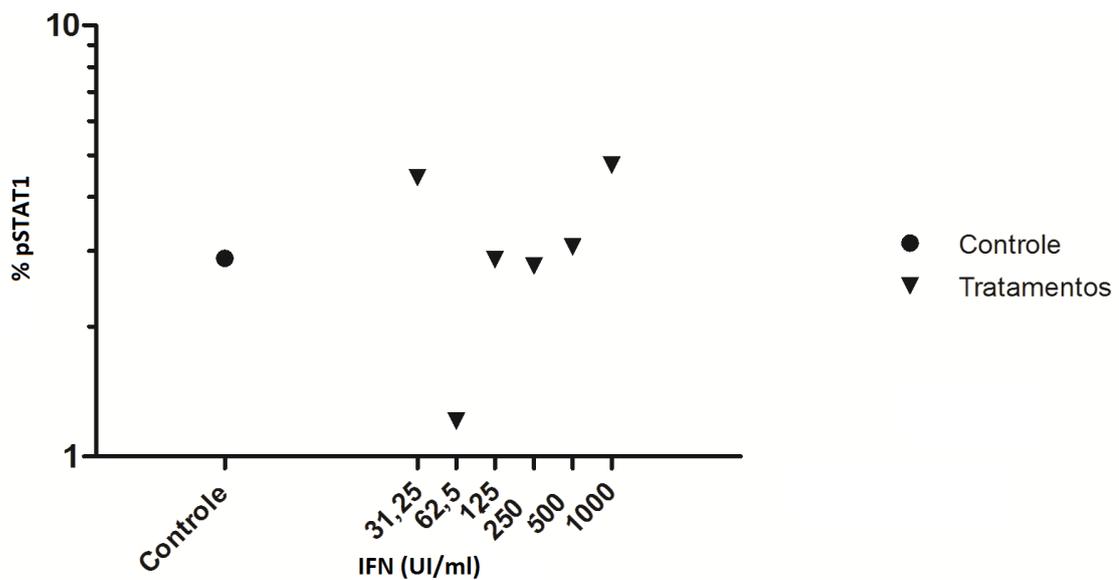


Figura 17 – Gráfico de indução de pSTAT1 em células HEPG2 após tratamento com o padrão de referência de interferon alfa 2b. Cada ponto representa a porcentagem de pSTAT1 obtida após o tratamento com diferentes doses, sendo o controle (células não tratadas com IFN).

5.4 COMPARAÇÃO ENTRE PSTAT1 E ENSAIO ANTIVIRAL

Para a comparação entre os dois ensaios foi utilizada um curva dose-resposta utilizando a linhagem celular Hep2C tratada com o padrão internacional de IFN alfa 2b. A curva dose-resposta do ensaio antiviral apresenta a característica de um curva sigmóide com uma queda da linearidade na dose de 1000 UI/ml do tratamento devido ao seu efeito citotóxico. Para a avaliação da linearidade dessa curva foram excluídos os valores de 0,001, 100 e 1000 UI/ml. Conforme a figura 18, as duas curvas apresentaram um comportamento linear nas doses utilizadas com um intervalo de confiança de 95% nos dois ensaios. O valor de p encontrado na curva do ensaio antiviral foi de 1, enquanto na curva do ensaio de pSTAT esse valor foi de 0,97.

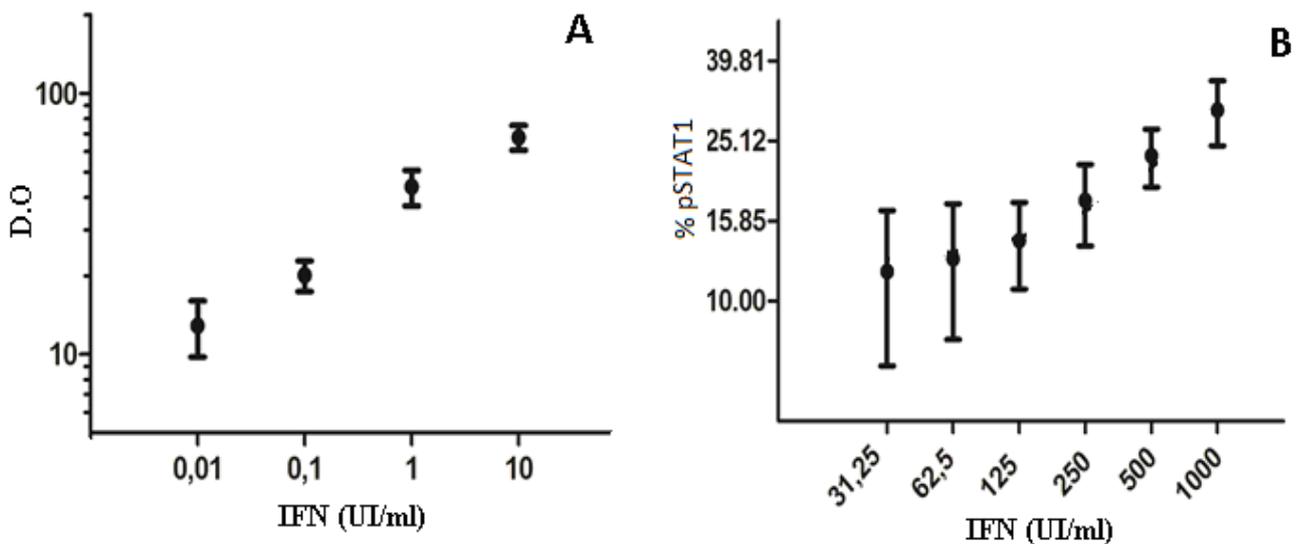


Figura 18- Comparação entre a curva dose-resposta obtida no ensaio antiviral (A) e na marcação de pSTAT1 por citometria de fluxo(B). Cada ponto representa a média de D.Os obtida nos ensaios antivirais em células Hep2C (A) e a média percentual de pSTAT1% obtida em células Hep2C (B).

5.5 ANÁLISE DE 2'-5' OAS COMO ALTERNATIVA PARA ENSAIO DE POTÊNCIA

5.5.1 Imunofluorescência

Com o objetivo de verificar a expressão da enzima 2'-5' OAS após o tratamento de IFN alfa 2b em células Hep2C, foi realizada uma cinética de expressão. As células foram estimuladas em diferentes tempos (1, 2 e 24 horas) com 500 UI/ml de IFN (Figura 19). A expressão dessa proteína pode ser observada a partir de 1h nas células tratadas, porém foi visto uma dispersão da fluorescência quando analisamos os outros intervalos da cinética. Com 1 hora de estímulo, o anticorpo anti-OAS alexa 488 parece se concentrar em uma região perinuclear e/ou nuclear, já após 2 h de estímulo a expressão dessa proteína passa a ser observada em toda região intracelular (Figura 19).

A análise das lâminas expostas ao IFN por 24 h demonstrou uma expressão semelhante a expressão observada no intervalo de 2 h (Figura 19). A expressão da 2'-5' OAS após 24 horas de tratamento em células Hep2C (A) e HepG2 (B) se mostrou bastante semelhante nas duas linhagens celulares, porém, em células HepG2 a marcação da OAS parece ser mais nítida quando comparada a marcação nas células Hep2C (Figura 20).

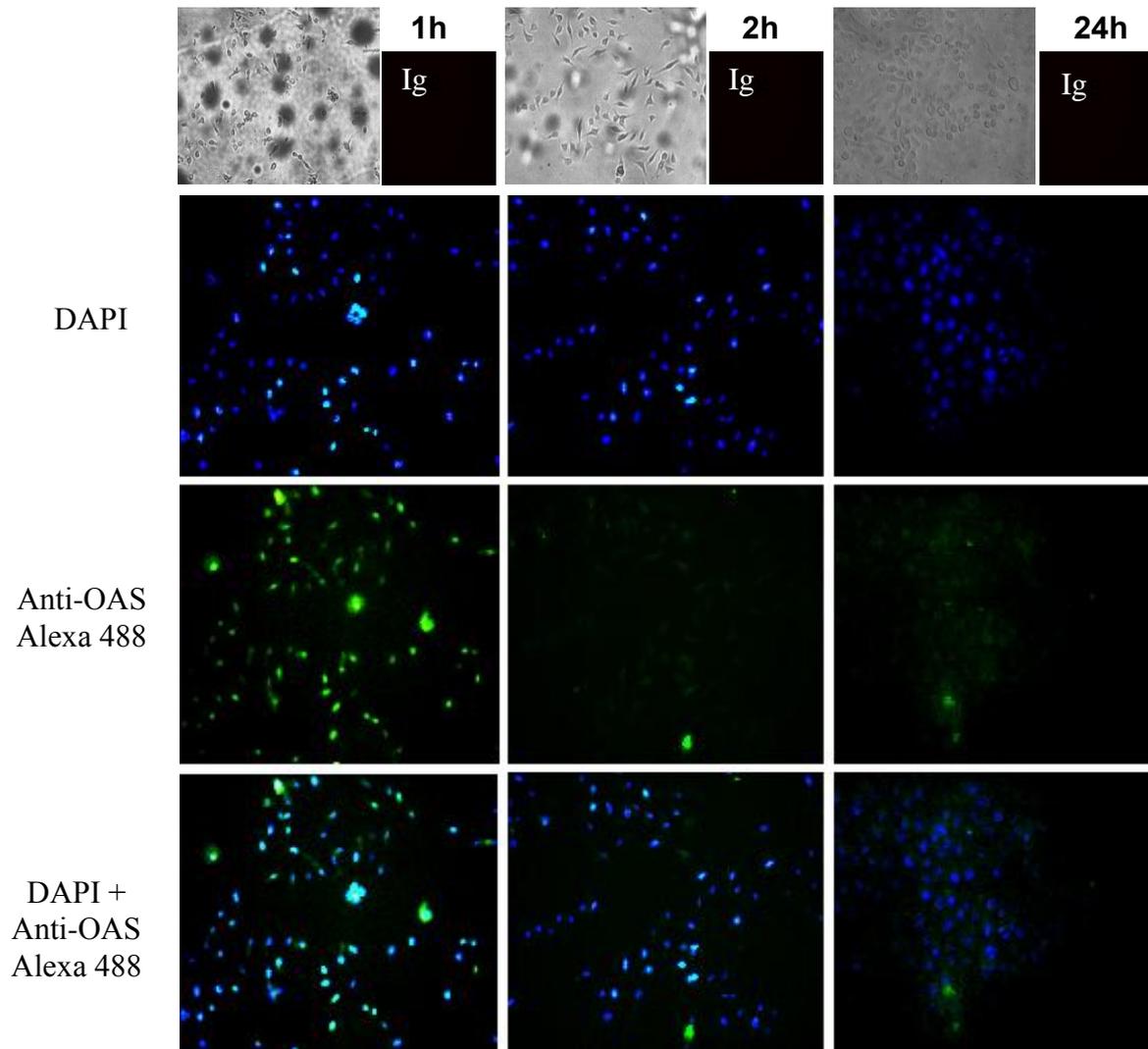


Figura 19: Cinética da expressão de 2'-5' OAS em células Hep2C após estímulo com 500 UI/ml de IFN alfa 2b recombinante. Células estimuladas com IFN por 1 h, 2 h e 24 h. Ig = controle negativo anticorpo secundário. Aumento de 40x.

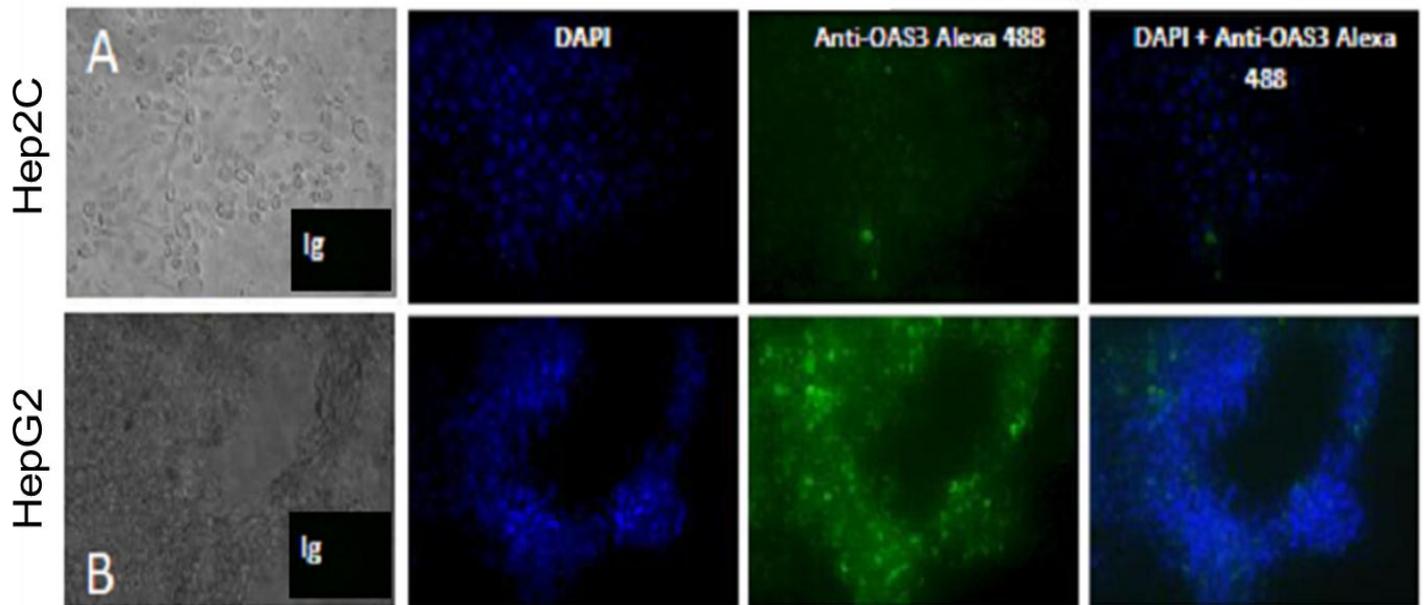


Figura 20- Expressão de 2'-5' OAS em células tratadas com IFN por 24 horas. Sendo A) células Hep2C e B) células HepG2. Ig= controle negativo. Aumento de 40x.

5.5.2 Citometria de fluxo

Com base na expressão de 2'-5'OAS por imunofluorescência, foi realizada a dosagem dessa proteína por citometria de fluxo. As células foram tratadas durante 24 horas com 1000 UI/ml de IFN alfa 2b. Os controles celulares que não foram tratados com IFN e marcados com anticorpo específico apresentaram altos níveis basais desta proteína, 44,56% em Hep2C e 23,80 % em HepG2 (Figura 21). O tratamento com IFN na dose de 1000 UI/ml induziu um aumento de cerca de 15% nos níveis dessa proteína em Hep2C e de 27% em HepG2 (Figura 21, A e B). Nas células Hep2C esse aumento é melhor observado através da intensidade de fluorescência, com média de 18,80 para o nível basal de 2'-5' OAS e de 21,94 para as células tratadas (Figura 21, A).

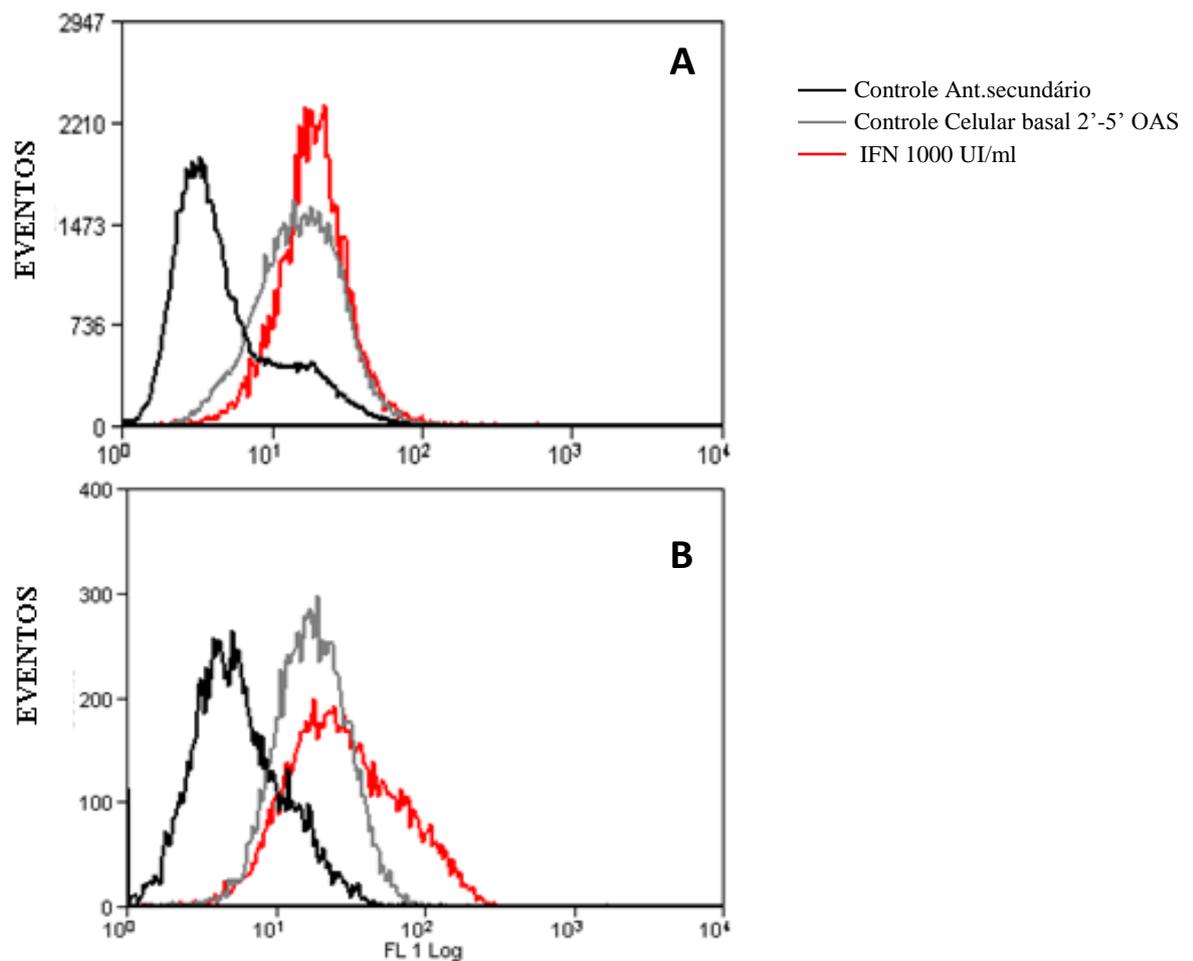


Figura 21- Gráfico de sobreposição original ilustrando a indução de 2'-5' OAS pelo tratamento com o padrão de referência de IFN na dose de 1000 UI/ml em células Hep2C (A) e HepG2 (B). Cada linha representa a quantidade de eventos (eixo y) e a intensidade de fluorescência (eixo X) do anti- OAS3 em uma dose específica.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Uma das propostas do trabalho foi comparar duas linhagens celulares (Hep2C e HepG2) no ensaio antiviral padronizado pelo nosso grupo de trabalho. O ensaio antiviral por si só possui muitas variáveis: a linhagem celular, a MOI e a cepa do vírus utilizada, o método de coloração, o efeito antiproliferativo do IFN, entre outros, além de demandar um grande tempo experimental e uma quantidade elevada de ensaios para a obtenção de uma potência satisfatória. Conforme descrito na literatura, ensaios antivirais apresentam uma grande variação (MEAGER, 2002). Os resultados obtidos tanto com Hep2C quanto com HepG2 confirmaram esta afirmação, no entanto os ensaios realizados utilizando a linhagem hepática apresentaram uma variação cerca de 150 vezes maior quando comparados aos realizados utilizando as células Hep2C, dentro das condições experimentais descritas neste manuscrito. De fato, a variação observada no ensaio com as duas linhagens não impediram o cálculo da potência do interferon alfa recombinante, demonstrando que o ensaio antiviral pode ser considerado viável para a avaliação da potência deste biofármaco nas duas linhagens. Além disso, os resultados de potência obtidos durante este trabalho foram semelhantes nas duas linhagens celulares. Neste contexto, podemos concluir que para realização do ensaio antiviral, seja com a célula Hep2C ou HepG2, faz-se necessário um grande número de ensaios para que um laudo sobre potência do IFN alfa 2b seja elaborado de forma estatisticamente segura. Novamente, esta conclusão vai de acordo com a literatura, onde já foi citado que ensaios antivirais para avaliação da potência do IFN devem ser várias vezes repetidos (MEAGER, 2002). Além disso, uma otimização e padronização da metodologia utilizando linhagens hepáticas para teste de potência de rotina buscando outros vírus como alternativa para a infecção, ajustes no tempo de incubação, entre outros fatores seria interessante, haja vista que principal utilização desta citocina como terapêutico é no tratamento da hepatite C crônica.

Em paralelo, uma curva dose-resposta das duas linhagens celulares no ensaio antiviral foi montada visando avaliar a resposta ao efeito anti-proliferativo do IFN. Neste contexto, medimos o efeito citopático através da metabolização de MTT e obtivemos as DOs. Em um estudo anterior do nosso grupo de trabalho com as células Hep2C foi visto que na dose de 1000 UI/ml essas células apresentavam DOs significativamente inferiores quando comparadas as DOs obtidas com a dose de 500

UI (Oliveira, 2010). O efeito observado anteriormente com as Hep2C foi reproduzido e, além disso, foi possível observar uma queda significativa da proteção celular na dose de 1000 UI/ml de IFN o que indicou uma alteração na viabilidade celular também em células HepG2. O efeito antiproliferativo que o IFN exerce sobre as células já foi descrito em diversas linhagens celulares como: melanomas, gliomas, carcinoma hepático, etc (HILFENHAUS *et al.*, 1976; BORDEN *et al.*, 1982; RIGBY *et al.*, 1985; DICK *et al.*, 1987; SHEARER *et al.*, 1987; JOHNS *et al.*, 1992; RESNITZKY *et al.*, 1992; CORADINI *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1994; GARRISON *et al.*, 1996; TAN & KATZE, 1999; DAMDINSUREN *et al.*, 2003). Além disso, a indução direta ou indireta de apoptose pelo interferon alfa foi descrita na literatura em diversos tipos celulares (CLEMENS, 2003; PESTKA *et al.*, 2004; ARULAMPALAM *et al.*, 2011). Sendo assim, decidimos verificar se o efeito antiproliferativo observado nas duas linhagens estudadas com a dose de 1000 UI de IFN poderia estar relacionado com uma possível indução de apoptose por esta citocina. Observamos, através da marcação com Anexina V por citometria de fluxo, que há apoptose e na dose mais alta 1000 UI a porcentagem de células Anexina V⁺ é maior quando comparada as outras doses. Isto poderia de fato estar comprometendo a viabilidade celular podendo interferir no resultado final do ensaio antiviral. Além disso, nosso grupo de trabalho observou um arraste no ciclo celular, nas fases S + G₂ na dose de 1000 UI/ml o que sugere que o efeito antiproliferativo do IFN observado nas doses mais altas do tratamento (OLIVEIRA, 2010). Estes dois fatores poderiam contribuir para a queda de proteção observada nas duas linhagens celulares quando submetidas à dose mais alta de IFN alfa 2b recombinante. Concluímos que este fato deve ser considerado na escolha das doses para realização do ensaio antiviral.

Além do ensaio antiviral, foi proposto como objetivo desta dissertação otimizar, comparar e verificar um ensaio alternativo ao ensaio antiviral. Dentro desta abordagem procuramos candidatos presentes na via de sinalização do IFN que funcionariam, segundo nossa hipótese inicial, como marcadores da atividade biológica dos Interferons podendo assim ser utilizados como desfecho para a avaliação da potência desta citocina. Destarte, sendo encontrado um efeito dose dependente do IFN nos níveis de intermediários fosforilados, no caso específico pSTAT1, e/ou nos níveis de efetores antivirais, no caso a 2'-5' OAS, estes candidatos poderiam ser realmente propostos como desfechos para ensaios alternativos aos ensaios antivirais. Na literatura já vem sendo propostos outros

ensaios alternativos, como o *gene report assay* (MEAGER, 2002), *Branched DNA* (MOORE *et al*, 2009) e a quantificação de pSTAT1 por citometria de fluxo (OLIVEIRA *et al*, 2012), sendo o último ensaio proposto por nosso grupo de trabalho. Das vantagens do ensaio com o pSTAT1 em relação aos outros ensaios pode-se considerar que além de ser um ensaio mais rápido, o que para testes de rotina é uma vantagem a ser considerada, o protocolo é de fácil realização e a análise é bastante simples. Entretanto, para consolidarmos este ensaio como proposta um número de repetições maior foi necessário. Além disso, em 2011 foi descrito que vias de sinalização, como Raf/MEK/ERK e PI3K-AKT poderiam ser induzidas por IFN alfa em determinados tipos celulares, podendo interferir em proteínas presentes na cascata de sinalização, como os STATs (CHRISTIAN *et al.*, 2009, Chai *et al.*, 2011), dessa forma a necessidade de procurar um desfecho mais específico ao final da cascata de sinalização tornou-se presente.

Neste trabalho, foi realizado um número maior de ensaios de pSTAT1 por citometria de fluxo em células Hep2C. Através dos resultados obtidos foi possível confirmar a linearidade da marcação dessa proteína após diferentes doses de tratamento com IFN alfa 2b nas células Hep2C. Como uma linhagem alternativa para a realização deste ensaio, as células HepG2 receberam o mesmo tratamento com diferentes doses de IFN alfa 2b para a marcação de pSTAT1, entretanto a linhagem hepática necessitou de um tempo superior de tratamento com IFN em relação as células Hep2C. Nas condições experimentais realizadas, não foi possível observar dose-dependência de pSTAT1 na linhagem hepática. Além do ensaio com o pSTAT1, medimos a proteína 2'-5' OAS nas duas linhagens tanto por imunofluorescência quanto por citometria de fluxo. Os dados obtidos até então são preliminares, contudo vale ressaltar que fomos o primeiro grupo a desenvolver um protocolo para medir esta proteína por citometria de fluxo, o que auxilia na quantificação da mesma. Com os resultados obtidos até aqui, podemos concluir que: as duas linhagens apresentaram positividade para o anticorpo OAS utilizado quando estimuladas pelo interferon. Houve, no entanto, uma marcação basal (sem estímulo de IFN) considerável.

Os resultados obtidos com as células HepG2 em relação ao pSTAT1 indicam que o IFN provavelmente induziu uma resposta antiviral, conforme vista tanto nos ensaios antivirais como no aumento da proteína efetora antiviral 2'-5' OAS, por uma outra via que não a de JTKs/STATs. A ativação da via MEK/ERK poderia levar a

atenuação da fosforilação de STAT1 e STAT2 em alguns tipos celulares, porém não influenciariam nos níveis de alguns efetores antivirais induzíveis pelo IFN, tais com PKR e 2'-5' OAS (CHAI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Outra possível via envolveria a ativação de PKI3/AKT (CHAI *et al.*, 2011). Segundo os autores, a modulação dos níveis da 2'-5' OAS poderia ser regulada pela bloqueio ou ativação desta cascata. Sendo assim, para elucidar o mecanismo pelo qual o IFN estaria induzindo um estado antiviral nas células HepG2 seriam necessários experimentos onde estas cascatas seriam moduladas e não só o pSTAT1 e a 2'-5'OAS mas também outros efetores antivirais fossem avaliados. Além disso, avaliar outras isoformas da 2'-5' OAS, a fim de verificar se todas as isoformas são induzidas da mesma maneira nas linhagens utilizadas seria relevante para confirmar a viabilidade do uso desta proteína como desfecho em um ensaio de potência. Outrossim, uma abordagem para a verificação de todas as isoformas da 2'-5'OAS poderia ser desenvolvida utilizando a técnica PCR em tempo real, que é quantitativa, visto que desta forma seria possível utilizar uma região comum a todos os genes de expressão desta proteína.

Em resumo, podemos concluir que as duas linhagens celulares podem ser utilizadas para os ensaios antivirais, salvo na dose de 1000 UI/ml onde há uma perda da linearidade do ensaio. Além disso, a alternativa proposta ao ensaio antiviral, dito ensaio pSTAT1, mostrou-se viável em células Hep2C. Por fim, a 2'-5'OAS pode ser uma enzima utilizada como desfecho de um ensaio de potência, caso se comprove a dose-dependência, no entanto esta também pode ser utilizada como um carimbo da atividade biológica do IFN. Em outras palavras, utilizando um ensaio onde um efetor antiviral ou intermediário fosforilado funcionem como desfecho, a avaliação do efeito biológico poderá ser feita através da detecção da 2'-5'OAS não necessitando, portanto, de um ensaio antiviral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN G, DIAZ M. Nomenclature of the human interferon proteins. **J. Interferon Cytokine Res.** 16, 181, 1996.

ARULAMPALAM V, KOLOSENKO I, HJORTSBERG L, BJORKLUND AC, GRANDÉR D, TAMM KP. Activation of STAT1 is required for interferon-alpha-mediated cell death. **Experimental cell research.** 317, 9-19, 2011.

BELMOKTARA C, HILLION J, SEGAL-BENDIRDJIAN B E. Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. **Oncogene**, 20, 3354-3362, 2001.

BILLIAU A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. **Adv. Immunol.** 62, 61. 1996.

BORDEN, E.C.; HOGAN, T.F.; VOELKEL, J.G. Comparative antiproliferative activity in vitro of natural interferons -alpha and -beta for diploid and transformed human cells. **Cancer Res.** 42, 4948-4953, 1982.

BOUILLON M, AUDETTE M. Transduction of retinoic acid and gamma-interferon signal for intercellular adhesion molecule-1 expression on human tumor cell lines: evidence for the late-acting involvement of protein kinase C inactivation. **Cancer Res.** 53, 826, 1993.

BRASIL, DECRETO Nº 79.094, de 5 de janeiro 1977. Regulamenta a Lei no 6.360, de 23 de setembro de 1976, que submete a sistema de vigilância sanitária os medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas, correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Diário Oficial da União, 05 de janeiro de 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 639, de 16 de junho de 2000. Aprova o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas - Hepatite viral crônica tipo C - Interferon + Ribavirina. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p. 33 jun. 2000, Seção 1.

BRASIL, RESOLUÇÃO ANVISA – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL, PORTARIA CONJUNTA Nº 92, DE 9 DE OUTUBRO DE 2008. Dispõe sobre o estabelecimento de mecanismo de articulação entre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a Secretaria de Vigilância em Saúde e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz sobre Farmacovigilância de Vacinas e outros Imunobiológicos no âmbito do Sistema Único de Saúde e define suas competências. Diário Oficial da União, 10 de outubro de 2008, p. 112, col.1.

BRASIL, Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico de Hepatites Virais. Departamento de Aids, DST e Hepatites Virais. Ano II, nº 1, 2011.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para Hepatite Viral C e co-infecções. Brasília, Ministério da Saúde, Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2011.

BRASIL, Tribunal de Contas da União. Relatório de avaliação de programa: Ação Assistência para Aquisição e Distribuição de Medicamentos Excepcionais / Tribunal de Contas da União; Ministro-Relator Lincoln Magalhães da Rocha. - Brasília: TCU, Secretaria de Fiscalização e Avaliação de Programas de Governo, 2004.100 p.

BRUNO R, SACCHI P, CIMA S, MAIOCCHI L, NOVATI S, FILICE G, FAGIUOLI S. Comparison of peginterferon pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles. **Journal of viral hepatitis**, 19 (Suppl.1), 33-36, 2012.

CHAI Y, HUANG H.L, HU D.J, LUO X, TAO Q.S, ZHANG X.L, ZHANG S.Q. IL-29 and IFN- α regulate the expression of MxA, 2'-5' OAS and PKR genes in association with the activation of Raf-MEK-ERK and PI3K-AKT signal pathways in HepG2.2.15 cells. **Mol Bio Rep**, 38:139-143, 2011.

CHOO Q.L, KUO G, WEINER A.J, OVERBY L.R, BRADLEY D.W & HOUGHTON M. Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B hepatitis genome. **Science**, 244: 359-362, 1989.

CHRISTIAN L.S, COLLIER W.T, ZU D, LICURSI M, HOUGH M.C, HIRASAWA K. Activated Ras/MEK inhibits the antiviral response of alpha interferon by reducing STAT2 levels. **Journal of virology**, p6717-6726,2007.

CLEMENS M. Interferons and Apoptosis. **Journal of Interferon & Cytokine research** 23:277-292, 2003.

CORADINI, D.; BIFFI, A.; PIRRONELLO, E.; DI FRONZO, G. The effect of alpha-, beta- and gamma-interferon on the growth of breast cancer celllines. **Anticancer Res** .14, 1779-1784, 1994.

COUNCIL OF EUROPE. Statistical Analysis of results of biological assays and tests, Chp. 5. in: The European Pharmacopoeia 7th ed. 2012.

COUNCIL OF EUROPE. Assay of Interferons. In: The European Pharmacopoeia 7th ed., Strasbourg, France. 2012.

COUNCIL OF EUROPE. Interferon alpha 2 concentrated solutions. In: The European Pharmacopoeia 7th ed., Strasbourg, France. 2012.

CHAWLA-SARKAR M, LINDNER DJ, LIU Y.F, SEM G.C, SILVERMAN R.H, BORDEN E.C. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**, 8(3):237-249, 2003.

DAMDINSUREN B.; NAGANO H.; SAKON M. Interferon-beta is more potent than interferon-alpha in inhibition of human hepatocellular carcinoma cell growth when used alone and in combination with anticancer drugs. **Ann Surg Oncol**. 10, 1184-1190, 2003.

DEBLANDRE G.A, MARINX O.P, EVANS S.S, MAJAJ S, LEO O, CAPUT D, HUEZ G.A, WATHELET M.G. Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. **J. Biol. Chem.** 270, 23860, 1995.

DELLGREN C, GAD H, HAMMING O.J, MELCHJORSEN J, HARTMANN R. Human interferon- λ 3 is a potent member of the type III interferon family. **Genes and Immunity.** 10, 125–131, 2009.

DEMAEYER E, DEMAEYER-GUIGNARD J. **Interferons and Other Regulatory Cytokines.** Wiley Interscience, New York, 1988.

DEUÑAS L, ALCANTAUD V, ALVAREZ F. Use of Inteferon alpha in Laryngeal Papillomatosis: eight years of the national program in Cuba. **J Laryngol Otol.** 111,134-140, 1997.

DÍAZ DE LA ROCHA A, MARÍA J, ALVAREZ M.J, SAGARÓ-DELGADO B, GUILLAMA E, LÓPEZ-SAURA P. Tratamiento combinado tópico y sistémico de condiloma acuminado con interferon alfa-2b o factor de transferencia. Estudio aleatorizado, a doble ciegas, controlado con placebo. **Bioteología Aplicada** 14(4), 248-252, 1997.

DICK, R.S.; HUBBELL, H. R. Sensitivities of human glioma cell lines to interferons and double-stranded RNAs individually and in synergistic combinations. **J Neurooncol.** 5, 331–338, 1987.

EDQM. COMBISTATS v5.0 – Council of Europe, www.combistats.eu

FELLOUS M, KAMOUN M, GRESSER I, BONO R. Enhanced expression of HLA antigens and b2-microglobulin on interferon-treated human lymphoid cells. **Eur. J. Immunol.** 9, 446, 1979.

FROUTAN PISHBIJARY H, ALAMDARY S.H, MIRMOMEN S.H. The efficacy and safety of Interferon Alfa (Heberon) for the treatment of chronic hepatitis B Infected subjects in Iran. Report from the Tehran University of Medical Science, Digestive Disease Research Center of “Emam Khomeini” Hospital. Abstract in **Bioteología Aplicada.** 18 (Special number – additional abstracts):E6, 2001.

FROKJAER S & HOVGAARD L (Ed). **Pharmaceutical Formulation Development of Peptides na proteins.** London. Taylor and Francis, 2000.

GARRISON, J.I, BERENS M.E, SHAPIRO J.R. et al. Interferon-beta inhibits proliferation and progression through S phase of the cell cycle in five glioma cell lines. **J Neurooncol.** 30, 213–223, 1996.

GIBSON UEM, KRAMER SM. Enzyme-linked bio-immunoassay for IFN-g by HLA-DR induction. **J. Immunol. Methods.** 125, 105, 1989.

GROSSBERG, S.E. AND SEDMAK, J. J. Assays of interferons. In: Billiau A (Ed.), **Interferon: 1. General and Applied Aspects.** Elsevier, Amsterdam, p. 189. 1984.

HERON I, HOKLAND M, BERG K. Enhanced expression of b2 -microglobulin and HLA antigens on lymphoid cells by type I interferons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 75, 6215, 1978.

HILFENHAUS J, DAMM H, KARGES H.E, MANTHEY K.F. Growthinhibition of human lymphoblastoid Daudi cells in vitro by interferonpreparations. *Arch Virol.* 51, 87–97, 1976.

HOKLAND M, HERON I, BERG K. Increased expression of beta 2-microglobulin and histocompatibility antigens on human lymphoid cells induced by interferon. **J Interferon Res.**1981; 1(4):483–494.

HOVNANIAN A, REBOUILLAT D, MATTEI M.G, LEVY E.R, MARIE I, MONACO A.P, HOVANESSIAN A.G. The human 2´-5´oligoadenylate syntethase locus is composed of three distinct genes clustered on chromossome 12q24.2 encoding the 100-,69-, and 40-kDa forms. **Genomics** 52:267-277, 1998.

ILANGUMARAN S, FINAN, D.HOKLAND M, BERG K. Interferon enhances the antibodydependent cellular cytotoxicity (ADCC) of human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.** 127, 1585, 1981.

IHLE J, KERR I. JAKs and STATs in signaling by the cytokine receptor superfamily. **Trends Genet.** 11, 69, 1995.

JOHNS, T. G.; MACKAY, I. R.; CALLISTER, K. A.; HERTZOG, P. J.; DEVENISH, R. J.; LINNANCE A. W. Antiproliferative potencies of interferons on melanoma cell lines and xenografts: higher efficacy of interferon beta. **J Natl. Cancer Inst.** v. 84, p. 1185-1190. 1992.

KJAERGARD L, KROGSGAARD K, GLUUD C. Interferon alpha with or without ribavirin for chronic hepatitis C: systematic re view of randomized trials. **BMJ.** 323, 1151-5, 2001.

KJAERGARD LL, KROGSGAARD K, GLUUD C. Ribavirin with or without alpha interferon for chronic hepatitis C [update of: Cochrane Database Syst Rev 2002;(1):CD002234]. **Cochrane Database Syst Rev** 2002;(2):CD002234.

KRISTIANSEN H, GAD H.H, ESKILDSEN-LASERN S, DESPRES P, HARTMANN R. The Oligoadenilato syntethase family: An ancient protein family with multiple antiviral activities. **Journal of interferon & cytokine research**,v.31,nº1, 2011.

LAUER G, WALKER B. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med.** 354, 41-52, 2001.

LENGYEL P. Biochemistry of interferons and their actions. *Annu. Rev. Biochem.* 51, 251, 1982.

LEVYS, TODD S.C, MAECKER H.T. CD81 TAPA-1: a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.** 16, 89, 1998.

LIANG T.J, REHERMANN B, SEEFF L.B, HOOFNAGLE J.H. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. **Ann Intern Med.** 132, 296-305, 2000.

MEAGER, A. Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization. In: Clemens MJ, Morris, A. G.; Gearing, A. J. H. (Eds.), *Lymphokines and Interferons: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, p. 129. 1987.

MEAGER, A. Bioimmunoassays for proinflammatory cytokines involving cytokine-induced cellular adhesion molecule expression in human glioblastoma cell lines. **J. Immunol. Methods.** 190, 235, 1996.

MEAGER A. *The Molecular Biology of Cytokines*. Wiley, Chichester, UK, p. 86, 1998a.

MEAGER A. Interferons alpha, beta, and omega. In: Mire-Sluis, A.R., Thorpe, R. (Eds.), **Cytokines. Academic Press**, SanDiego, p. 361, 1998b.

MEAGER, A. Biological assays for interferons. *J Immunol. Methods.* 261, 21–26, 2002.

MEAGER, A. Assays for antiviral activity. In: De Ley M (Ed.), **Cytokine Protocols** (Methods in Molecular Biology 249). Humana Press, Totowa, NJ, p. 121. 2003.

MEAGER, A. *The interferons: characterization and application*. Weinheim, Germany. ed. WILEY-VCH - Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

MOORE M, MEAGER A, WANDHWA B. Measurement of neutralising antibodies to type I interferons by gene expression assays specific for type 1 interferon-inducible 6-16 Mrna. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 49 ,534–539, 2009.

MOSMANN T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** 65, 55-63, 1983.

MYERS R.P, REGIMBEAU C, THEVENOT T, LEROY V, MATHURIN P, OPOLON P, ZARSKI J.P, POYNARD T. Interferon for interferon naive patients with chronic hepatitis C. **Cochrane Database Syst Rev**; (2):CD000370, 2002.

NAGATA S, MANTEI N, WEISSMANN C. The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon-a. **Nature** (London). 287, 401, 1980.

OLIVEIRA, E.R.A. Estudo da atividade biológica do Interferon alfa-2b em linhagem de células Hep2C para aplicação em ensaios de determinação de potência. 2010. 82f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

OLIVEIRA E.R.A, LIMA B.M.M.P, SANTOS B.A.F, MOURA W.C, NOGUEIRA A.C.M.A. Potency determination of recombination IFN-alpha based on phosphorylated STAT1 using flow cytometry. **Journal of immunological methods**, 375, 271-275, 2012.

PANARETAKIS T, HJORTSBERG L, TAMM K.P, BJORKLUND A.C, JOSEPH B, GRANDER B. Interferon alpha induces nucleus-independent apoptosis by activating extra signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase downstream of phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. **Mol.Bio.Cell**,19, 41-50, 2008.

PAWLOTSKY M.J, HOVANESSIAN G.A, ROUDOT-THORAVAL F, ROBERT N, BOUVIER M, BABANY G, DUVAL J, DHUMEAUX D. Effect of alpha interferon(IFN- α) on 2'-5'oligoadenylate syntetase activity in peripheral blood mononuclear cells of patients with cronic hepatitis C: relationship to the antiviral effect of IFN- α . **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p 320-324, 1996.

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

PYZDEK T. Pyzdek's guide to SPC, Quality Publishing, LLC, Tucson. Vol 1, Fundamentals, Ch 9, Control charts for individuals, pp 102-109, 1998.

POYNARD T, LEROY V, COHARD M. Meta analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis, effects of dose and duration. **Hepatology**. 24, 778-89, 1996.

QUESADA J.R, GUTTERMAN J.U, HERSH E.M. Treatment of hairy cell leukemia with alpha interferons. **Cancer**. 57(8 Suppl):1678-80, 1986.

RESNITZKY D, TIEFENBRUN N, BERISSI H, KIMCHI A. Interferons and interleukin-6 suppress phosphorylation of the retinoblastoma protein in growth sensitive hemopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. 89, 402–406, 1992.

RICE A.P, DUNCAN R, HERSHEY J.W.B, KERR I.M. Doublestranded RNA-dependent protein kinase and 2-5A system are both activated in 80 interferon-treated, encephalomyocarditis virus infected HeLa cells. **J. Virol**.54, 894, 1985.

RIGBY, W. F.; BALL, E. D.; GUYRE, P. M.; FANGER, M. W. The effect of recombinant-DNA-derived interferons on the growth of myeloid progenitor cells. **Blood**. v. 65, p. 858-861. 1985.

SACKAR M.C, LINDNER D.J, WILLIAMS B.R, SEN G.C, SILVERMAN R.H, BORDEN E.C. Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**. 8: 237-249, 2003.

SADLER A. & WILLIAMS B. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nature reviews – Immunology**. (8): 559-568, 2008.

SAMUEL C.E. Interferon induction of the antiviral state proteins induced by interferons and their possible roles in the antiviral mechanisms of action. In: Pfeffer, L.M. (Ed.), *Interferon Actions*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 110, 1987.

SCHAEFER K.A. The cell cycle: a review. **Vet. Pathol**, 35:461, 1998.

SEN G.C, LENGYEL P. The interferon system: a bird's eye view of the biochemistry. **J. Biol. Chem.** 267, 5017, 1992.

SHEARER M., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. Regulation of cell growth by interferon. **Cancer Metast Rev.** 6, 199–221, 1987.

SILVERMAN H.R. Viral encounters with 2'-5' oligoadenylate synthetase and RNase L during the Interferon antiviral response. **Journal of virology**, p.12720-12729, 2007.

STAEHELI P. Interferon-induced genes and the antiviral state. **Adv. Virus Res.** 38, 147, 1990.

STARK G.R, KERR I.M, WILLIAMS B.R, SILVERMAN R.H, SCHREIBER R.D. How cells respond to interferons. **Annu. Rev. Biochem.** 67, 227, 1998.

STEVENSON N.J, MURPHY A.G, BOURKE N.M, KEOGH C.A, HEGARTY J.E, O'FARRELLY C. Ribavirin enhances IFN- α signalling and MxA expression: A novel immune modulation mechanism during treatment of HCV. **PLoS ONE** 6(11): e27866, 2011.

STEWART II W.E. *The Interferon System*. Springer-Verlag, Viena, 1979.

SVARCH E, GONZÁLEZ OTERO A, VERGARA DOMÍNGUEZ B, et al. Tratamiento de las leucemias en Cuba (1973 – 1995). **Rev Cub Hematología Inmunología.** 12(2), 112-117, 1996.

TAN S.L. & KATZE M. G. The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death. **J Interferon Cytokine Res.** 19, 543–554, 1999

VERMEULEN K, BOCKSTAELE V.R.D, BERNEMAN N.Z. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell prolifer**, 36, 131-149, 2003.

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods.** 184(1):39-51, 1995.

VOGEL S.N, FINBLOOM S, ENGLISH K.E, ROSENSTREICH D.L, LANGRETH S.G. Interferon-induced enhancement of macrophage Fc receptor expression: b-interferon treatment of C3H/HeJ macrophages results in increased numbers and density of Fc receptors. **J. Immunol.** 130, 1210, 1983.

WHO - World Health organization, EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION, Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities- Draft. Geneva, 2010. Disponível em: www.who.int/entity/biologicals/BS2128_Lot_Release_CLEAN.pdf

WHO- World Health organization. Guidance on prevention of viral hepatitis B and C among people who inject drugs. Geneva, 2012. Disponível em: apps.who.int/iris/bitstream/10665/75192/1/WHO_HIV_2012_18_eng.pdf

ZHANG K, KUMAR R. Interferon- α inhibits cyclin E and cyclin-D1-dependent CDK-2 kinase activity associated with RB and E2F in Daudi cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 200, 522–528, 1994.

ZHANG Q, GONG R, QU J, ZHOU Y, LIU W, CHEN M, LIU Y, ZHU Y, WU J. Activation of the Ras/Raf/MEK pathway facilitates hepatitis C virus replication via attenuation of the interferon-JAK-STAT pathway. **Journal of virology**, p. 1544-1554, 2011.