

EDSON ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO INTERFERON ALFA-2B EM
CÉLULAS HEP-2C PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO
DE POTÊNCIA**

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2010

**Estudo da Atividade Biológica do Interferon alfa-2b em Células Hep-2C
para Aplicação em Ensaio de Determinação de Potência**

Edson Roberto Alves de Oliveira

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dr^a Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Dr. Wlamir Correa de Moura

Rio de Janeiro

2010

Oliveira, Edson Roberto Alves de

Estudo da Atividade Biológica do Interferon alfa-2b em Linhagem de Células Hep-2C para Aplicação em Ensaios de Determinação de Potência / Edson Roberto Alves de Oliveira. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.

xviii, 82 f.; il. tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007.

Orientadores: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira e Wlamir Correa de Moura.

1. IFN alfa-2b 2. Hep-2C 3. Atividade biológica 4. Ensaio de Potência 5. Vírus Mengo. I. Título.

Título em inglês: Study of biological activity of IFN alpha-2b in Hep-2C cell line for application in potency determination assays

Estudo da Atividade Biológica do Interferon alfa-2b em Células Hep-2C para Aplicação em Ensaios de Determinação de Potência

Edson Roberto Alves de Oliveira

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 em

Dr^a. Juliana de Meis (IOC/FIOCRUZ)

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

Dr. Fábio Coelho Amendoeira (INCQS/FIOCRUZ)

Orientadores:

Dr^a Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Dr. Wlamir Correa de Moura

Rio de Janeiro
2010

A minha orientadora por, primeiramente, ter me aceitado como aluno além de todo o seu empenho e esforço neste trabalho.

Aos meus pais, Sr. José e Sr^a. Josefa, pelo sempre fiel apoio.

AGRADECIMENTOS

De alguma forma, direta ou indiretamente, foram muitas as pessoas que contribuíram pela realização deste trabalho. Algumas, porém, eu não poderia deixar de citar e fazer um especial agradecimento:

- A prof^a. Ana Cristina Nogueira, por ter me aceitado repentinamente como aluno.
- Ao prof. Wlamir Moura pela co-orientação e disposição a qualquer momento.
- Ao prof. Fábio Amendoeira pela revisão dos textos.
- A prof^a. Maria Helena pelo gentil fornecimento do anti-pSTAT1
- A Priscila do laboratório de inflamação do IOC pela gentil doação da colchicina.
- 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 constante ajuda durante a etapa experimental.
- A estagiária Bruna pela colaboração e dedicação neste trabalho.
- A toda equipe do SEPOT de Biomanguinhos pelo treinamento inicial e pela gentil doação do vírus Mengo.
- A aluna Bárbara pela colaboração nos experimentos.
- As funcionárias Cláudia e Sinéia do Departamento de Química do INCQS pela constante ajuda com reagentes e equipamentos.
- Ao Octávio do Departamento de Farmacologia e Toxicologia pela disponibilização do aparelho de ELISA
- A CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigado.

“A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência”.

(Goethe)

RESUMO

A família dos interferons (IFNs) compreende um grupo de citocinas secretadas por todas as células nucleadas presentes em mamíferos, conhecidas pelas suas atividades antivirais, antiproliferativas e imunomoduladoras. Com o advento da tecnologia de DNA recombinante, tornou-se possível a produção e o isolamento de grandes quantidades de IFNs, os quais vêm sendo utilizados clinicamente no tratamento de diversas enfermidades, como a hepatite C. Ao mesmo tempo, tem ocorrido uma crescente demanda no controle da qualidade destes biofármacos. Neste trabalho, estudamos a atividade biológica do IFN alfa-2b em linhagem de células Hep-2C para aplicação em ensaios de potência. Foi padronizado um ensaio antiviral para determinação de potência do IFN alfa-2b utilizando a combinação Hep-2C/vírus Mengo, no entanto vimos que a atividade antiproliferativa causada pelo IFN alfa-2b em células Hep-2C impacta negativamente na análise final dos dados. Ao considerar a via de transdução intracelular estimulada pelos IFNs, vimos mediante citometria de fluxo, que em células Hep-2C existe dose-dependência entre a ocorrência de intermediários fosforilados (pSTAT1) e a dose de IFN alfa-2b (entre 35,25 e 1000 UI/ml) empregada na estimulação destas células. Em seu conjunto, mostramos nesta tese que o ensaio de redução do efeito citopático viral para determinação da potência do IFN alfa-2b utilizando a combinação Hep-2C/vírus Mengo é informativo, porém vários aspectos devem ser considerados para minimizar prejuízos na análise final de dados. Ainda, sugerimos que a aplicação da citometria de fluxo na determinação de intermediários fosforilados em células Hep-2C seja bastante promissor no desenvolvimento de novos ensaios biológicos para a determinação de potência relativa do IFN alfa-2b.

ABSTRACT

The family of interferons (IFNs) is a group of cytokines secreted by all mammalian cells, known to exert anti-viral, anti-proliferative and immunomodulatory activities. With the advent of recombinant DNA technology, the production and isolation of large amounts of IFNs have been possible. As the recombinant IFNs have been clinically used in the treatment of many diseases such as hepatitis C, nowadays there is a noticeably growing demand in the quality control of these biopharmaceuticals. In this work, we studied the biological activity of IFN alpha-2b in Hep-2C cell lines for application in potency assays. An anti-viral assay for potency determination of IFN alpha-2b was standardized using the combination Hep-2C cells/Mengo virus. However, we noticed that the antiproliferative activity caused by IFN alpha-2b on Hep-2C cells yields a negative impact on final data analysis. In addition, considering the intracellular transduction pathway stimulated by IFNs, we observed using flow cytometry technique, that there is a dose-dependent correlation between phosphorylated intermediates (pSTAT1) and the dose of IFN alpha-2b (from 35.25 to 1000 IU / ml) applied in the stimulation of Hep-2C cells. Globally, this thesis shows that the cytopathic effect reduction assay for potency determination of IFN alpha-2b using the Hep-2C cells/Mengo virus combination is informative, but several aspects should be considered in order to minimize loss of quality in the final data. Still, we suggest that the application of flow cytometry in the determination of phosphorylated intermediates in Hep-2C cells is quite promising in the development of new biological assays for the determination of the relative potency of IFN alpha-2b.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Expressão gênica dos IFNs tipo I.....	10
Figura 2. Panorama do sistema IFN- α/β	12
Figura 3. Sinalização através dos receptores de IFN.	14
Figura 4. Comparação entre métodos de coloração com MTT e cristal violeta.....	46
Figura 5. Viabilidade de células Hep-2C após tratamento com IFN alfa-2b pelo método do MTT	47
Figura 6. Análise do ciclo celular de células Hep-2C tratadas com IFN alfa-2b	49
Figura 7. Valores percentuais correspondentes ao somatório das fases S e G2 do ciclo celular para os diferentes tratamentos de células Hep-2C com IFN alfa-2b.	49
Figura 8. Células L929 na produção da suspensão do vírus Mengo	50
Figura 9. Gráfico de controle dos ensaios antivirais reproduzidos com o padrão internacional de IFN alfa-2b.....	52
Figura 10. Dados dos ensaios antivirais, utilizando o padrão internacional de IFN alfa-2b, após aplicação do modelo logístico de quatro parâmetros.....	53
Figura 11. Análise de interferência no teste antiviral	55
Figura 12. Estudo de cinética da marcação intracelular de pSTAT1 em células Hep-2C	58
Figura 13. Relação entre a dose de IFN alfa-2b e a quantidade de pSTAT1 observada em células Hep-2C	59
Figura 14. Estimativa da potência de duas preparações de IFN alfa-2b mediante marcação com anticorpo monoclonal anti-pSTAT1 por método de citometria de fluxo	61

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação de câmara de Neubauer.....	30
Esquema 2. Organização de placa de 96 poços para a determinação do título da suspensão de vírus Mengo.....	34
Esquema 3. Distribuição de diluições da suspensão celular em placa de 96 poços para os ensaios de comparação entre os métodos de coloração com MTT e cristal violeta	35
Esquema 4. Organização de placa de 96 poços para os ensaios de potência do IFN alfa-2b, baseado na redução do efeito citopático	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Compilação de alguns principais biofármacos com patentes vencidas	6
Quadro 2. Algumas combinações entre vírus e linhagens celulares para ensaios de redução do efeito citopático viral.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os procedimentos usando MTT e cristal violeta para determinação de viabilidade celular em células Hep-2C	45
Tabela 2. Parâmetros de precisão entre procedimentos colorimétricos de MTT e cristal violeta	45
Tabela 3. Titulação do Vírus Mengo em células Hep-2C	50
Tabela 4. Determinação da potência relativa de IFN alfa-2b pelo método da redução do efeito citopático viral	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância
ATCC: *American Type Culture Collection*
BSS-CMF: solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio
CARD: *caspase recruitment domain*
CBP: *cAMP-response element-binding protein*
CCID₅₀: dose viral capaz de infectar 50% das células em cultura
DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DNA: ácido desoxirribonucléico
DO: densidade óptica
dsRNA: ácido ribonucléico de fita dupla
ECACC: *European Collection of Cell Cultures*
ED₅₀: dose de IFN alfa-2b capaz de induzir 50% de efeito inibitório da ação citopática causada pelo vírus Mengo
EDpstat1₅₀: A dose observada de IFN alfa-2b que causou 50% do efeito máximo na ativação de STAT1
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF: fator de crescimento epidérmico
eIF2: *eukaryotic initiation factor 2*
EMCV: vírus da encefalomiocardite murina
FACS: *fluorescence activated cell sorting*
FDA: *Food and Drug Administration*
HCV: vírus da hepatite C
ICAM-1: molécula-1 de adesão intercelular
IFN: interferon
IFNAR1: receptor 1 do interferon- α
IFNAR2: receptor 2 do interferon- α
IFNLR1: receptor 1 de IFN- λ
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina
IKK ϵ : *inhibitor of kappa B kinase ϵ*
IL-10R2: receptor 2 de interleucina-10
INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IRAK-1: *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*
IRAK-4: *interleukin-1 receptor-associated kinase 4*
IRF3: fator 3 de regulação do interferon
IRF7: fator 7 de regulação do interferon
IRF9: fator 9 de regulação do interferon
ISG: genes induzidos por interferon
ISGF3: fator 3 de estimulação gênica do IFN
ISRE: *interferon stimulated response element*
JAK1: *janus kinase 1*
MDA5: *melanoma-differentiation-associated gene 5*
MHC: complexo principal de histocompatibilidade
MOI: multiplicidade de infecção
MTT: 3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo
MyD88: *myeloid differentiation factor 88*
NIBSC: *National Institute of Biological Standards and Control*
OECD: Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica
OMS: Organização Mundial de Saúde
PAMP: padrão molecular associado à patógeno
PBS: tampão fosfato salino
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PIV5: vírus Parainfluenza 5
PKR: proteína quinase R
PRR: receptor de reconhecimento padrão
pSTAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição fosforilado
RIG-I: *retinoic-acid-inducible protein 1*
RNA: ácido ribonucléico
RNase L: endonuclease latente
SFB: soro fetal bovino
SFV: vírus da Floresta de *Semliki*
SINV: vírus *Sindbis*
SNC: sobrevivência normalizada de células
ssRNA: ácido ribonucléico de fita simples
STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição
TBK-1: *TANK binding kinase - 1*

TGF: *transforming growth factor*

TLR: receptores *toll-like*

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

TYK2: *tyrosine-protein kinase 2*

VSV: vírus da Estomatite Vesicular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Biotecnologia e biofármacos	2
1.1.1 Aspectos econômicos.....	4
1.1.2 Principais proteínas terapêuticas	6
1.2 Os interferons	7
1.2.1 Produção endógena dos interferons tipo I.....	8
1.2.2 Mecanismo de ação	10
1.2.2.1 Atividade antiviral	13
1.2.2.2 Atividade antiproliferativa	15
1.2.2.3 Atividade imunomoduladora	15
1.3 Utilidade clínica	16
1.3.1 Preparações disponíveis e em desenvolvimento	16
1.3.1 Hepatite C	17
1.4 Controle da qualidade de produtos biotecnológicos	18
1.4.1 Bioensaios.....	18
1.4.2 Determinação da atividade de interferons	20
1.4.2.1 Ensaio antiviral	21
2. OBJETIVO & JUSTIFICATIVA	26
3. MATERIAIS & MÉTODOS	28
3.1 Cultivo de células	28
3.1.1 Manutenção das linhagens.....	28
3.1.2 Preparo de suspensão celular	29
3.1.3 Determinação de concentração da suspensão celular	30
3.2 Manipulação viral	30
3.2.1 Replicação do vírus Mengo	31
3.2.2 Manipulação e purificação do vírus Mengo	31
3.2.3 Determinação da dose viral capaz de infectar 50% das células em cultura (CCID ₅₀)	32
3.3 Métodos colorimétricos para determinação da viabilidade celular	32

3.3.1 MTT	33
3.3.2 Cristal violeta.....	33
3.3.3 Comparação entre os métodos colorimétricos: cristal violeta e MTT	34
3.4 Preparo do padrão e amostras do interferon alfa-2b	35
3.5 Ensaio de viabilidade celular	36
3.6 Ciclo celular	36
3.6.1 Preparo da solução de ribonuclease A livre de DNase	36
3.6.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	37
3.7 Ensaio antiviral	38
3.7.1 Análise de interferência no ensaio antiviral	40
3.8 Marcação intracelular de STAT1 fosforilado (pSTAT1).....	41
3.8.1 Cinética da ativação de STAT1	41
3.8.2 Relação entre a dose de IFN alfa-2b e pSTAT1.....	42
3.8.3 Determinação da potência relativa de IFN alfa-2b mediante marcação intracelular de pSTAT1.....	42
4. RESULTADOS.....	44
4.1 Procedimentos colorimétricos: cristal violeta e MTT.....	44
4.2 Ensaio de viabilidade celular	46
4.3 Análise do ciclo celular.....	48
4.4 Replicação e titulação do vírus Mengo	50
4.5 Ensaio antiviral.....	51
4.5.1 Padronização	51
4.5.2 Análise de interferência no ensaio antiviral	54
4.5.3 Determinação da potência relativa de IFN alfa-2b pelo método da redução do efeito citopático viral.....	55
4.6 Marcação intracelular de pSTAT1	56
4.6.1 Determinação da potência relativa de IFN alfa-2b mediante marcação intracelular de pSTAT1.....	59
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÃO & PERSPECTIVAS	71
6.1 Conclusões	71

6.2 Perspectivas	72
REFERÊNCIAS.....	74

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biotecnologia e biofármacos

De acordo com a última definição da Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica (OECD), a biotecnologia é “a aplicação da ciência e da tecnologia em organismos vivos, assim como em suas partes, para alterar seres vivos e materiais inanimados visando a produção de conhecimento, bens e serviços” (OECD, 2001).

Historicamente, o uso da biotecnologia teve o seu início com os processos fermentativos. A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida pelos sumérios e babilônios antes do ano 6.000 a.C. Mais tarde, por volta do ano 2.000 a.C., os egípcios, que já utilizavam o fermento para fabricar cerveja, passaram empregá-lo também na fabricação de pão. Outras aplicações como a produção de vinagre, iogurte e queijos, são também, há muito tempo utilizadas pelo ser humano. Entretanto, não eram conhecidos os agentes causadores das fermentações que ficaram ocultos por seis milênios. Somente no século dezessete, o pesquisador Antom Van Leeuwenhock, através da visualização em microscópio, descreveu a existência dos seres microscópicos. Foi somente 200 anos depois, em 1876, que Louis Pasteur provou que a causa das fermentações era em decorrência da ação de microorganismos, e não se tratava de um processo puramente químico como até então era acreditado.

A produção de antibióticos foi o grande marco de referência na fermentação industrial. A partir de 1928, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, muitos tipos de antibióticos foram desenvolvidos no mundo. Na década de 40, durante a segunda guerra mundial, os antibióticos passaram a integrar os processos industriais fermentativos, principalmente nos Estados Unidos, baseando-se inicialmente na síntese da penicilina e, posteriormente, da estreptomicina.

Foi a partir da década de 50 que a biotecnologia, com a descoberta da síntese química do ácido desoxirribonucléico (DNA), e com as técnicas de manipulação genética como DNA recombinante e fusão celular, passaram de fato a existir. A técnica do DNA recombinante envolve a criação sintética de novos organismos vivos, com características não encontradas na natureza, formadas pela hibridização em nível molecular do DNA. Essa técnica permite, por exemplo, o enxerto de genes humanos que determinam a produção de insulina em bactérias. Isso levou a produção industrial da insulina humana, substituindo com grandes vantagens, a insulina bovina ou suína empregadas no tratamento de diabéticos (VILLEN, 2010).

O advento da tecnologia de DNA recombinante, considerada a maior evolução científica do século, possibilitou o desenvolvimento de diversas tecnologias gênicas, as quais vêm trazendo benefícios inestimáveis para a humanidade. Atualmente, as empresas de biotecnologia utilizam técnicas e processos para: o desenvolvimento de produtos ou serviços na obtenção de organismos geneticamente modificados; o aumento da produtividade agrícola; a melhoria de processamento alimentar; a utilização de recursos energéticos renováveis; aplicações ambientais; a obtenção de princípios ativos, fármacos, e intermediários para a indústria farmacêutica e de química fina (FARDELONE, 2006).

As principais aplicações da biotecnologia moderna na área de saúde são o uso da engenharia genética para a produção de biofármacos, vacinas e os estudos genômicos para prevenção e cura de diversas doenças (terapia gênica e farmacogenômica). Os medicamentos desenvolvidos por biotecnologia utilizam proteínas provenientes de seres vivos, visando combater infecções e doenças e corrigir deficiências genéticas. No setor farmacêutico também existem os kits para diagnóstico de doenças e para terapia gênica, no qual se utiliza o próprio material genético como fármaco para corrigir deficiências genéticas hereditárias (FARDELONE, 2006).

O termo “biofármacos” é utilizado para designar proteínas e substâncias derivadas de ácidos nucleicos, usadas com finalidade terapêutica ou para diagnóstico *in vivo* e produzidas por meios que não a extração direta de fontes biológicas (MORAES, 2007).

Em uma compilação realizada pela associação norte-americana de empresas farmacêuticas (PhRMA), verificou-se que no ano de 2004 cerca de uma centena de biofármacos já havia logrado aprovação junto à agência regulatória norte-americana (*Food and Drug Administration, FDA*). Nessa compilação, verificou-se que 324 novos produtos biológicos, voltados para cerca de 150 diferentes doenças, encontravam-se, naquele ano, em fase de desenvolvimento, seja em ensaios clínicos ou já com pedido de registro em avaliação pela FDA. Dos produtos em desenvolvimento, quase metade (154) direcionava-se ao tratamento do câncer. Outra porção significativa (102) destinava-se a doenças infecciosas, síndrome da imunodeficiência adquirida e condições associadas, assim como distúrbios auto-imunes e neurológicos. Mesmo levando-se em consideração que o desenvolvimento de um biofármaco é um processo demorado e que grande parte das moléculas em testes não consegue obter registro, é de se esperar que o número de biofármacos em comercialização cresça significativamente nos próximos anos. Estima-se que, até os dias atuais, mais de 250 milhões de pessoas, em todo o mundo, já tenham se beneficiado dos produtos biológicos já aprovados, seja pelo tratamento ou prevenção de doenças cardíacas, esclerose múltipla, diversos tipos de câncer, hepatites, artrite e diabetes entre outras. Com sua ação fundamentada na base molecular das doenças, os biofármacos estão fornecendo aos médicos e pacientes novas ferramentas para o tratamento de enfermidades, alterando, fundamentalmente, o modo pelo qual as doenças são combatidas (FARDELONE, 2006).

1.1.1 Aspectos econômicos

A indústria farmacêutica apresenta uma variedade de produtos, como químicos sintéticos, naturais e biotecnológicos, sendo as principais empresas globalizadas e integradas. O setor farmacêutico é baseado na inovação

tecnológica e na propriedade intelectual na forma de patentes que garantem exclusividade de mercado e geram altos ganhos. As grandes empresas farmacêuticas e as empresas de biotecnologia que surgiram nos últimos anos concentram a produção de biofármacos, bem como o setor de pesquisa e desenvolvimento. Tais empresas estão localizadas, sobretudo nos países desenvolvidos, como os Estados Unidos, os países europeus e o Japão. Em muitos casos, o desenvolvimento desses produtos envolve parcerias entre os grandes laboratórios multinacionais, empresas de biotecnologia e as universidades e instituições de pesquisa. O mercado de biofármacos vem ganhando destaque devido aos grandes avanços científicos e ao grande volume de investimentos (FARDELONE, 2006).

Globalmente, o mercado de biofármacos que em 2005 estava avaliado em US\$ 48 bilhões, cresceu no período de 2000 a 2004, à taxa anual de 19%, bastante superior à taxa de crescimento da indústria farmacêutica como um todo. A previsão é de que até o final desta década, o mercado atinja US\$ 100 bilhões (MORAES, 2007).

No ano de 2000 as vendas do setor de biofármacos representavam 22,7 bilhões de dólares (6,4% do total do mercado de medicamentos). No período de 2001 a 2002 ocorreu um crescimento superior a 19% ao ano, chegando a 32,4 bilhões de dólares em 2002 (7,6% do total do mercado). Devido ao grande número de investimentos no setor de pesquisa de desenvolvimento e ao lançamento de inúmeros produtos nos anos de 2003 e 2004, esse segmento proporcionou um crescimento de 27,5% e 47%, respectivamente, gerando lucros da ordem de US\$ 41,3 e US\$ 60,7 bilhões de dólares nos anos de 2003 e 2004. Em 2005 as vendas foram da ordem de US\$ 70,8 bilhões de dólares (11,8% do mercado farmacêutico). Apesar da desaceleração de crescimento em relação aos anos de 2003 e 2004, este mercado mostra-se extremamente significativo quando comparado ao setor farmacêutico como um todo, pois as vendas de biofármacos triplicaram em cinco anos. Além disso, quando comparados ao setor de medicamentos, os biofármacos praticamente duplicaram sua participação em

porcentagem, demonstrando o dinamismo desse segmento (FARDELONE, 2006). Ainda, o processo de expiração de patentes de biofármacos, que ocorre alguns anos após o licenciamento original gerado pelas indústrias responsáveis pelo desenvolvimento inicial destes produtos, ocasiona um grande impacto econômico neste setor (Quadro 1.1).

Quadro 1. Compilação de alguns principais biofármacos com patentes vencidas.

Nome comum ou descrição	Vencimento da patente
Insulina humana recombinante	2001
Alglicerase	2001
Interferon alfa-2b	2002
Somatotrofina (hGH)	2003
Alteplase	2005
Interferon beta-1a	2005
eritropoetina alfa	2006
Filgrastima	2006
Imiglicerase	2006
Etanercepte	2006
Interferon beta-1b	2007

Fonte: NOTHENBERG, 2008.

1.1.2 Principais proteínas terapêuticas

As proteínas terapêuticas podem ser divididas em grupos distintos: o grupo das citocinas que incluem os interferons, fatores de crescimento hematopoiético (como eritropoetina, e fatores estimulantes de colônias de granulócitos e macrófagos), fator de crescimento transformante (*transforming growth factor* - TGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), entre outros; hormônios que compreende principalmente a insulina, o glucagon, o hormônio do crescimento e as gonadotrofinas; as enzimas terapêuticas como o ativador de plasminogênio tecidual e a uroquinase (que são dois agentes trombolíticos) e α -galactosidase A (usada na doença de Fabry onde o indivíduo não sintetiza corretamente esta enzima para o metabolismo de lipídeos); os fatores de

coagulação sanguínea incluindo os fatores VII, VIII e IX (proteínas cuja falta constitui na doença genética conhecida como hemofilia); e anticorpos, como por exemplo, o bevacizumab que atua como inibidor do fator de crescimento endotelial auxiliando terapias antitumorais (MORAES, 2007).

Em sua maioria os biofármacos são proteínas de estrutura complexa, que sofrem diferentes modificações pós-tradução, como por exemplo, a glicosilação a qual na maioria dos casos é essencial para conferir atividade biológica à proteína. Por essa razão, a maioria dos biofármacos já aprovados e em desenvolvimento são produzidos por cultivo de células de mamíferos, já que células microbianas e de insetos apresentam limitações quanto à sua capacidade de realizar corretamente as modificações pós-tradução requeridas (MORAES, 2007).

1.2 Os inteferons

A família dos interferons (IFNs) compreende um grupo de citocinas secretadas por todas as células nucleadas presentes em mamíferos. De acordo com a seqüência de aminoácidos, os IFNs são agrupados em três classes denominadas IFNs tipo I, II e III. Os IFNs tipo I foram descobertos em 1957 (ISAACS & LINDENMANN, 1957) e abrangem um grande grupo de moléculas; mamíferos possuem vários genes distintos para IFN- α (13 presentes em humanos), um a três genes para IFN- β (um presente em humanos) e outros genes para IFN- ω , - ϵ , - τ , - δ e - κ . Os genes dos IFN- α e - β são induzidos diretamente em resposta a uma infecção viral, enquanto que os outros IFNs tipo I desempenham ações menos conhecidas e ainda não muito bem descritas na literatura. O tipo II de IFN possui apenas um membro chamado de IFN- γ ou “interferon imune”. Este não é secretado diretamente em resposta a uma infecção viral, e sim por células do sistema imune como as células T ativadas e as células *natural killers* (VON BUDNOFF et al., 2010). Os IFNs tipo III foram descritos mais recentemente e compreendem o IFN- λ 1, - λ 2, e - λ 3, também chamados de interleucina-29 (IL-29), IL-28A e IL-28B, respectivamente (ANK & PALUDAN, 2006; UZE & MONNERON, 2007). Estas citocinas também têm seus níveis aumentados em resposta a

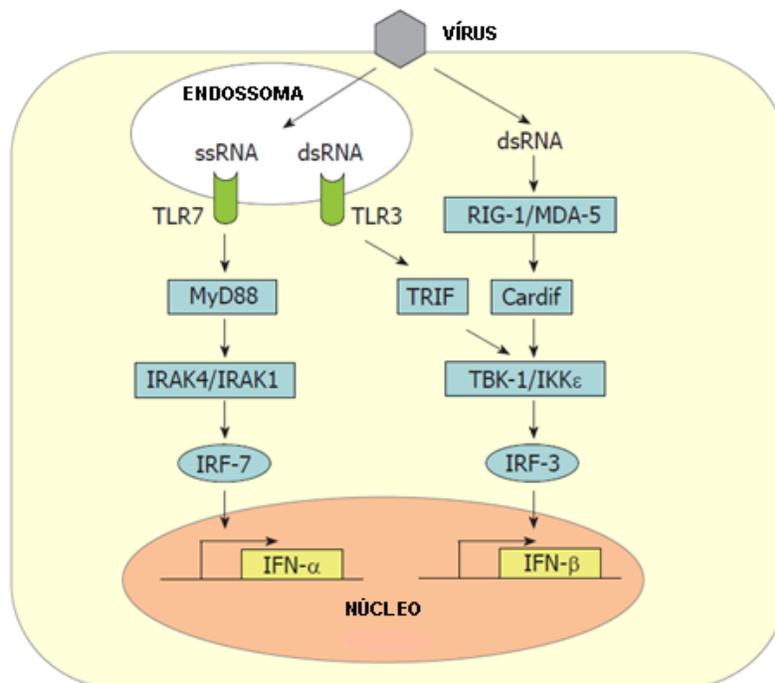
infecções virais e para isso parecem utilizar a mesma via de sinalização intracelular para a expressão gênica dos IFN- α/β (ONOGUCHI et al., 2007).

1.2.1 Produção endógena dos IFNs tipo I

Durante os últimos anos, a compreensão dos eventos de sinalização celular em resposta a infecção viral teve avanços significativos. Estudos feitos entre os anos 60 e 70 com indutores de IFN demonstraram que ácido ribonucléico (RNA) sintético de fita dupla (dsRNA) atua de maneira muito eficaz no estímulo para a produção de IFN- α/β (DE CLERC, 2006). No entanto, não apenas dsRNAs (sintético ou viral) atuam como excelentes indutores. RNAs virais de fita simples (ssRNA) também podem ser detectadas mediante a interação destes com receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células. Existem diversas maneiras pelas quais as células reconhecem a presença de um microorganismo invasor e várias rotas moleculares que transduzem sinais até a síntese de IFN (RANDALL & GOODBOUM, 2008).

A indução de IFN- α/β em fibroblastos é a mais estudada e é denominada de “via clássica de indução”. Em células infectadas, diversas vias de sinalização intracelular são ativadas por diferentes tipos de ácido nucléico viral, os quais são gerados durante a replicação e a transcrição do genoma viral. Estas moléculas, também referidas como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), podem ser detectadas por PRRs os quais podem estar aderidos a membranas endossomais (receptores *toll-like*, TLRs) ou livres no citoplasma (RIG-I - *retinoic-acid-inducible protein 1* e MDA5 - *melanoma-differentiation-associated gene 5*). Após a detecção de ácido nucléico viral livre no citoplasma por RIG-I e MDA5, um domínio protéico denominado *caspase recruitment domain* (CARD) presente nestes PRRs é ativado e passa a interagir com seu adaptador citoplasmático (Cardif). O complexo resultante recruta duas proteínas quinases (IKK ϵ - *inhibitor of kappa B kinase ϵ* e TBK-1 - *TANK binding kinase - 1*) que ativam o fator 3 de regulação do IFN (IRF3). A forma ativada do IRF3 se homodimeriza e migra em direção ao núcleo onde recruta coativadores de transcrição (p300 - proteína 300 e CBP - *cAMP-response element-binding protein*) que auxiliam na interação com a

região promotora do gene do IFN- β , dando início a síntese de RNA mensageiro para esta proteína. Quando o reconhecimento do ácido nucléico viral se dá pelos TLRs, a transdução de sinal ocorre por diferentes adaptadores citoplasmáticos. O TLR3 utiliza TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) como adaptador, compartilhando da mesma via citoplasmática dos PRRs RIG-1 e MDA-5 para a produção de IFN- β . O TLR7 faz uso do adaptador MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), que quando ativado recruta outros elementos citoplasmáticos (IRAK-4 - *interleukin-1 receptor-associated kinase 4* e IRAK-1) que formam um complexo maior (MyD88-IRAK-4-IRAK-1) capaz de ativar o fator 7 de regulação do IFN (IRF7). O IRF7 quando ativado, transloca-se ao núcleo e estimula a transcrição do gene do IFN- α (Figura 1.1). Uma vez sintetizados, os IFNs- α/β são secretados podendo interagir com células vizinhas ou mesmo com a célula inicialmente infectada, promovendo sua atividade antiviral (WEBER, 2007).



Modificado de Weber, F. *Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system. World J Gastroenterol.* 13(36): 4818-4823 (2007).

Figura 1. Expressão gênica dos IFNs tipo I. A detecção viral de RNA fita simples (ssRNA) e RNA fita dupla (dsRNA) leva a ativação de promotores dos genes para IFN- α e IFN- β mediante fatores de regulação do interferon IRF-3 e IRF-7, respectivamente. A fosforilação de ambos os fatores ocorre mediante atividade de proteínas quinases que são ativadas por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e seus respectivos adaptadores citoplasmáticos. RIG-1 e MDA-5 são PRRs pertencentes à família das helicases, que reconhecem dsRNA viral e ativam a via TBK-1/IKK ϵ mediante o adaptador citoplasmático Cardif, resultando na ativação do IRF-3. Para os dsRNAs presentes em endossomas, o reconhecimento ocorre mediante PRRs denominadas receptores *toll like*. A isoforma 3 destes receptores (TLR3) compartilha da mesma via das helicases para a produção de IFN- β , mediante o adaptador citoplasmático TRIF. O TLR7 reconhece ssRNA viral presente em endossomas, que mediante o adaptador MyD88 ativa a via IRAK4/IRAK1 que leva a ativação de IRF-7 para a produção de IFN- α .

1.2.2 Mecanismo de ação

Os IFNs- α/β atuam mediante um receptor comum presente na superfície das células ativando vias de transdução de sinais intracelulares que desencadeiam a transcrição de diversos genes (Figura 1.2). Tais genes são conhecidos como

genes induzidos por IFNs (ISGs) e são responsáveis por estabelecerem uma resposta antiviral em células alvo. Um subgrupo de ISGs pode ser induzido diretamente por uma infecção viral através de um mecanismo independente de IFNs, conferindo um grau de proteção em células primariamente infectadas. No entanto, um estudo feito com camundongos que não expressavam o receptor de IFN- α/β sugeriu que esta proteção é mínima quando comparada com a resposta desencadeada pelo próprio IFN. Os IFNs- α/β também modulam o sistema imune no sentido de desenvolver a resposta imune adquirida (RANDALL & GOODBOUM, 2008).

Os IFNs tipo III também são secretados e se ligam a receptores presentes na superfície das células promovendo ação antiviral equivalente à dos IFN- α/β . IFNs tipo III também podem ser induzidos em diversos tipos celulares, porém apresentam atividade limitada com relação a distribuição dos tecidos (MEAGER et al., 2005-a; MENNECHET & UZE, 2006; ZHOU et al., 2007). Atualmente, o papel dos IFNs tipo III ainda não é bem esclarecido e existem poucas evidências de que estes elementos contribuem de maneira essencial para a sobrevivência do hospedeiro em resposta a uma infecção viral (RANDALL & GOODBOUM, 2008).

A ação dos IFNs tipo I e tipo III é mediada por 2 complexos receptores localizados na superfície das células: um heterodímero composto por duas cadeias protéicas, denominadas receptor 1 do IFN- α (IFNAR1) e receptor 2 do IFN- α (IFNAR2), interage com os IFNs tipo I; e uma outra estrutura heteróloga formada a partir de duas cadeias (receptor 2 de interleucina-10, IL-10R2, associado com o receptor 1 de IFN- λ , IFNLR1) interage com os três membros dos IFNs tipo III. Após a ligação do IFN tipo I ao seu receptor, uma transdução de sinal é iniciada a partir de proteínas tirosino-quinases (JAK1 - *janus kinase 1* e TYK2 - *tyrosine-protein kinase 2*) pré-associadas à porções citoplasmáticas do receptor de IFN, as quais fosforilam o próprio receptor levando ao recrutamento e a ativação de transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs). Quando ativados, os STATs formam um heterodímero (STAT1-STAT2) que ainda no citoplasma se associa ao fator 9 de regulação do IFN (IRF9) formando um complexo

heterotrimérico denominado fator 3 de estimulação gênica do IFN (ISGF3). O ISGF3 é translocado em direção ao núcleo onde induz um grupo de ISGs a partir da sua interação com o ISRE (*interferon stimulated response element*) (Figura 1.3) (SADLER & WILLIAMS, 2008).

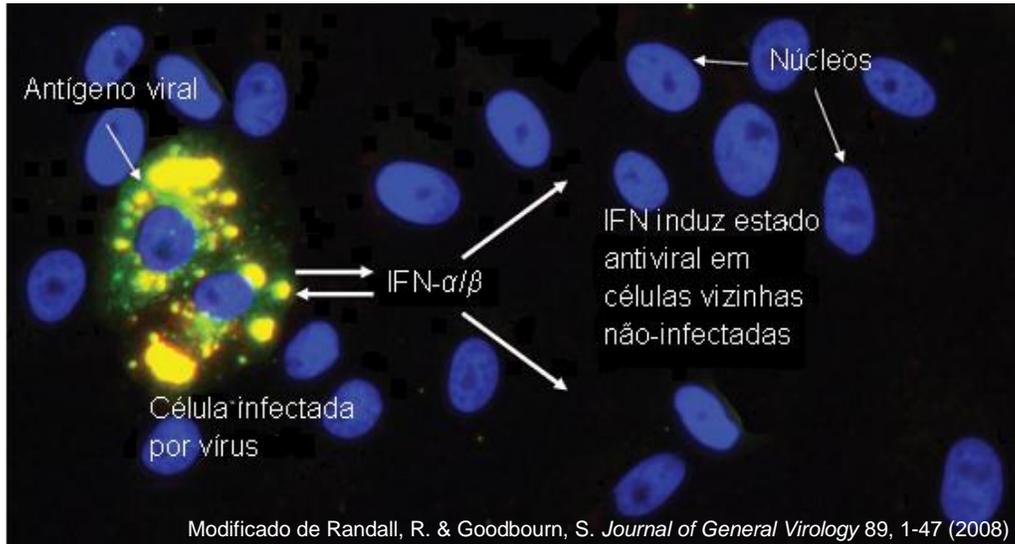
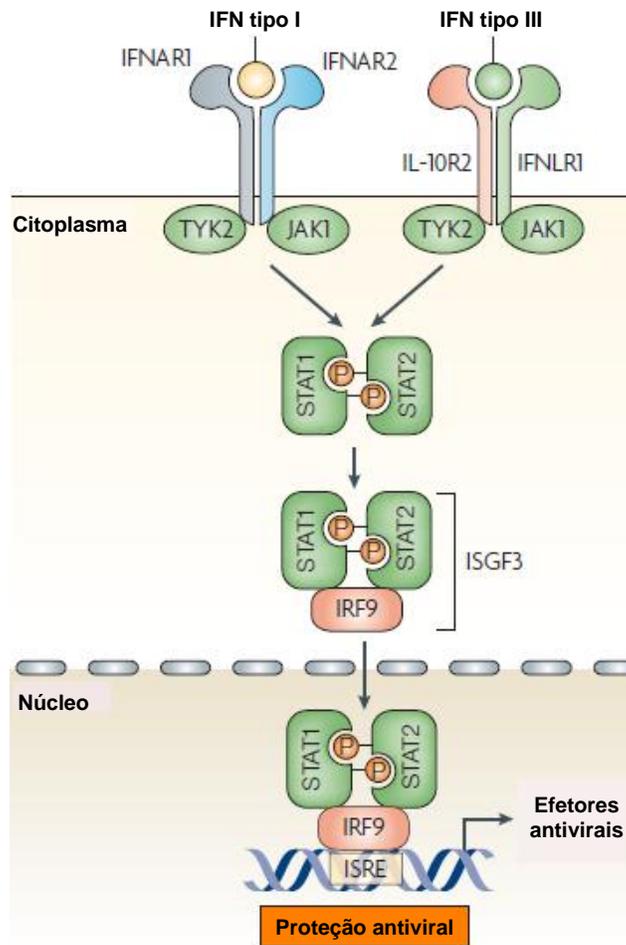


Figura 2. Panorama do sistema IFN- α/β . Células que secretam IFN- α/β possuem receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que detectam moléculas associadas com a infecção. Tais moléculas incluem ácidos nucleicos virais como dsRNA. Os PRRs uma vez estimulados pelo seu ligante apropriado ativam cascatas de sinalização intracelular que levam a transcrição dos genes de IFN- α/β . O IFN produzido é secretado e interage com receptores presente na superfície de células vizinhas não-infectadas (isto também ocorre na célula inicialmente infectada) promovendo a expressão de centenas de proteínas, muitas das quais têm efeito direto ou indireto na atividade antiviral. Os vírus formados a partir da célula inicialmente infectada replicam de forma ineficiente em células com o estado antiviral induzido. A figura mostra uma monocamada celular infectada a 0,01 unidade formadora de placa por célula com o vírus Parainfluenza 5 (PIV5). Após 24 horas, as células foram coradas com anticorpo específico para o antígeno viral e com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para corar o núcleo das células.

A indução de ISGs leva a expressão de diversas proteínas relacionadas com o desenvolvimento de um estado antiviral intracelular. Algumas proteínas possuem atividade antiviral direta, outras atuam como PRRs e outras como fatores de transcrição formando um *loop* de amplificação que aumenta a produção de interferon, aumentando a proteção celular contra a infecção viral e dificultando o seu alastramento. Proteínas induzidas que possuem atividade antiviral direta incluem moléculas que catalisam remodelamento do citoesqueleto, induzem apoptose, regulam eventos pós-transcricionais e proteínas que estão envolvidas em modificações pós-traducionais (SADLER & WILLIAMS, 2008).

1.2.2.1 Atividade antiviral

Foram identificadas várias proteínas com papel importante na supressão da propagação viral. Por exemplo, a 2-5 A sintetase é uma proteína ácido ribonucléico dupla-fita dependente (dsRNA), 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; ZHOU et al., 1993) 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; KUMAR et al., 1988). Uma segunda e importante proteína antiviral, principalmente induzida por IFN tipo I, é uma proteína quinase dsRNA-dependente conhecida como PKR (proteína quinase R), a qual fosforila e inativa o fator de iniciação peptídico, eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*), envolvido na tradução polirribossomal do RNA mensageiro viral (LENGYEL, 1982; SAMUEL, 1987; STAEHELI, 1990).



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.

1.2.2.2 Atividade antiproliferativa

Provavelmente os sistemas “2-5 A sintetase – RNase L” e “PKR – eIF2” induzidos por interferon, estão também envolvidos na proliferação celular (LENGYEL, 1993; MEURS et al., 1993; BARBER et al., 1995; STARK et al., 1998; TAN e KATZE, 1999). Foram caracterizados altos índices nos níveis de 2-5 A sintetase e enzimas RNase L em células de crescimento lento, sugerindo que a presença destas proteínas estejam envolvidas na regulação da proliferação (LENGYEL, 1993). Adicionalmente, uma gama de outros mecanismos induzidos por interferon, incluindo a depleção de metabólitos essenciais (SEKAR et al., 1983; DE LA MAZA e PETERSON, 1988) e supressão de oncogênes (genes relacionados com o desenvolvimento de tumor) (CONTENTE et al., 1990) podem contribuir para a atividade antiproliferativa do interferon.

1.2.2.3 Atividade imunomoduladora

Os interferons são conhecidos pela indução de várias respostas imunes, dentre elas, o aumento da expressão de moléculas presentes na superfície celular, antígenos do tipo I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC de classe I) e receptores Fc de imunoglobulinas G, envolvidas no reconhecimento imune (HERON et al., 1978; FELLOUS et al., 1979; HOKLAND e BERG, 1981; VOGEL et al., 1983; DE MAEYER e DE MAEYER-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, necessário para disparar tanto a imunidade humoral, como a imunidade mediada por células (GIBSON & KRAMER, 1989; BILIAU, 1996; DE MAEYER e DE MAEYER-GUINARD, 1988). A expressão de moléculas de adesão celular, como a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) (BOUILLON & AUDETTE, 1993; MEAGER, 1996) e outras moléculas marcadoras de superfície celular (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.

1.3 Utilidade clínica

Com o advento da tecnologia biotecnológica moderna e a prática do DNA recombinante, tornaram-se possíveis a produção e o isolamento de grandes quantidades de IFN- α e IFN- β . Estes IFNs recombinantes vêm sendo utilizados clinicamente no tratamento de alguns tumores (como carcinoma renal, câncer cutâneo, melanoma maligno, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiplo, leucemia mielóide crônica, linfoma não-Hodgkin, etc.), da esclerose múltipla e de algumas doenças virais (como as hepatites virais, papilomatose respiratória recorrente, condiloma acuminado, etc.) principalmente na hepatite C crônica (MEAGER, 2006).

1.3.1 Preparações disponíveis e em desenvolvimento

Desde a primeira aprovação de dois IFNs recombinantes (IFN α -2a e α -2b) pelo órgão regulador norte-americano FDA, muitos outros produtos (IFN β -1a, β -1b, etc.) foram desenvolvidos e diversos estudos foram feitos com relação à eficácia clínica destas preparações biológicas. Muitos sistemas de expressão são utilizados para a produção comercial do IFN- α/β . Os dois primeiros IFNs aprovados no mercado foram ambos produzidos em *Escherichia coli* (*E. coli*). Atualmente, existem também preparações biológicas de IFNs obtidos a partir de expressão em leveduras (IFN α -2a produzido em *Hansenula polymorpha* e IFN α -2b em *Pichia pastoris*) com a vantagem de ser um processo mais simplificado em relação ao uso de *E. coli* como sistema de expressão. Outro IFN utilizado na clínica é um produto não-recombinante derivado de leucócitos, que contém uma mistura natural de subtipos de IFN- α . Estudos também foram feitos para a melhoria dos padrões farmacocinéticos dos IFNs utilizados clinicamente. Como resultado, atualmente os IFN também podem ser conjugados com polímeros de polietileno glicol (chamados IFNs peguilados, conferindo meia-vida plasmática 10 vezes maior quando comparado a IFNs não-peguilados), com albumina humana (em desenvolvimento), ou ainda com nanopartículas de poliaminoácidos (em desenvolvimento), para melhorar os perfis farmacocinéticos das preparações (MEAGER, 2006; CLARK & NELSON, 2009).

1.3.2 Hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é membro da família *Flaviviridae* a qual está associada com doenças em animais e humanos. A família *Flaviviridae* compreende pelo menos três gêneros distintos: *pestivirus*, os quais causam doenças em gado e em suínos; *flavivirus*, os quais causam doenças importantes como a dengue e a febre amarela; e *hepacivirus*, o qual o HCV é o único membro (FORNS & BUKH, 1999).

O HCV, causador da hepatite C, foi caracterizado em 1989 por Michael Houghten e colaboradores, e trata-se de um vírus de RNA, envelopado e com diâmetro compreendido entre 60-80 nm. Atualmente, são conhecidos onze genótipos do HCV, os quais diferem em 30-50% quando comparadas as seqüências de nucleotídeos, e diversos subtipos entre eles. A grande heterogeneidade gênica, as mutações e a variação antigênica entre os vírus HCV provavelmente explica a dificuldade de estabelecer uma terapia única e eficaz contra infecções em humanos, causando também transtornos no desenvolvimento de vacinas.

As infecções pelo HCV são muito comuns em todo o mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que há quase 200 milhões de portadores ou doentes crônicos de hepatite C no mundo (3% da população mundial). Na Europa a incidência é de cerca de 0,3% da população, mas nos EUA é de 1,5%. Em Portugal estima-se que entre 1 a 1,5% da população seja portadora do vírus e que apenas 20 a 25 mil estejam diagnosticados. No Brasil, em doadores de sangue, a incidência da hepatite C é de cerca de 1,2%. Embora o HCV seja transmitido pelo contato direto, percutâneo ou através de sangue contaminado, em um percentual significativo de casos não se identifica a via de infecção (CIORLIA, 2007). Em 85% dos casos, a infecção pode progredir para um estado crônico, dos quais aproximadamente 20% das pessoas infectadas desenvolvem cirrose hepática e 2-5% evoluem para carcinoma hepatocelular. A hepatite C é atualmente a principal causa de transplante hepático em países desenvolvidos e responsável por 60% das hepatopatias crônicas (STRAUSS, 2001).

Os primeiros benefícios clínicos para a hepatite C utilizando o IFN- α foram anunciados em 1986 por Hoofnagle et al. Porém, somente 15-20% dos pacientes alcançavam uma resposta viral sustentável (carga viral de HCV não detectável por pelo menos 6 meses seguidos após o tratamento) quando o IFN- α foi utilizado em esquema de monoterapia. Em 1998, foi introduzida uma terapia combinada com IFN- α e um análogo sintético de guanósina denominado ribavirina. Estudos clínicos para esta combinação demonstraram que era possível alcançar resposta viral sustentável em 38-43% dos infectados pelo HCV quando tratados por 12 meses. Outro avanço na terapia contra a hepatite C foi alcançado com o desenvolvimento de IFNs peguילים. O esquema terapêutico mais preconizado atualmente contra infecções pelo HCV é o uso da combinação entre IFN- α peguילado e ribavirina que em média confere a 60% dos casos, o alcance da resposta viral sustentável (MEAGER, 2006).

1.4 Controle da qualidade de produtos biotecnológicos

O desenvolvimento de materiais biológicos como agentes terapêuticos envolve garantias quanto à sua segurança, eficácia e qualidade. A segurança e a eficácia se estabelecem por meio de estudos de toxicidade bem controlados e de ensaios clínicos. Além disso, os ensaios biológicos são importantes como indicadores de segurança, uma vez que podem detectar potenciais desvios e estimam eficácia como medida direta da atividade biológica. A qualidade deve ser confirmada utilizando-se uma variedade de técnicas analíticas, que em seu conjunto permitam avaliar a pureza, a potência biológica, a estabilidade e a consistência na produção (MORAES, 2007).

1.4.1 Bioensaios

Os métodos para determinar a potência de produtos biológicos obtidos por técnicas de DNA recombinante são de fundamental importância, uma vez que medem a atividade do produto. Apesar de existirem numerosas técnicas físico-químicas para caracterizar a estrutura de um produto protéico e a presença de contaminantes, estes fornecem pouca ou nenhuma informação a respeito de sua

potência biológica. Um bioensaio é definido como um ensaio funcional e nenhum teste físico-químico pode medir essa função. Um ensaio biológico de uma citocina não é reflexo da sua eficácia clínica, somente ensaios clínicos podem demonstrar isso (THORPE et al., 1997). Além disso, a potência medida em um ensaio *in vitro* não deve ser empregada como indicador da atividade biológica no ser humano.

Entende-se por bioensaio como um procedimento analítico que utiliza um sistema biológico correspondente (resposta biológica/funcional) com o objetivo de medir a quantidade de componente efetivo em um produto biológico, para determinar sua potência biológica (MIRE-SLUIS, 1996). O método mais apropriado para determiná-la é mediante a comparação da atividade biológica de uma amostra com um padrão de referência bem caracterizado. A atividade biológica medida por esses métodos, expressa em unidades internacionais, deve conservar relação direta com a massa do produto. Isto significa que o efeito biológico medido (atividade) por unidade de massa deve comportar-se como uma constante com valor dentro de limites claramente especificados e autorizados. O intervalo de confiança fornece uma indicação da precisão com a qual a potencia foi determinada no ensaio. Este é calculado com referencia ao modelo experimental e ao tamanho da amostra. O intervalo de confiança de 95% é normalmente escolhido para ensaios biológicos (COUNCIL OF EUROPE, 2008-a).

Os primeiros tipos de bioensaios avaliavam os efeitos das citocinas em animais, ao lhes ser administradas, e mediam a resposta neles induzida. Contudo, bioensaios feitos em animais mostram grande variabilidade nas estimativas de potência, são muito caros, implicam um trabalho intensivo e, às vezes, requerem o sacrifício de muitos animais com o propósito de prover dados estatisticamente válidos. Com o advento da tecnologia de cultivo de células, um animal poderia servir como fonte de grande número de amostras de células ou tecidos, expandindo consideravelmente a utilidade dos bioensaios. Atualmente, a maioria dos bioensaios para citocinas é realizada empregando-se linhagens celulares monoclonais que podem crescer de forma indefinida. O uso destas linhagens apresenta a vantagem de não requerer colônia de animais e também a sua

disponibilidade imediata a partir de banco de células congelados. Ainda, é possível gerar uma grande economia com reagentes, tempo e obter boa homogeneidade nos ensaios. As principais desvantagens estão associadas a uma pequena perda da função celular natural e a uma tendência a sofrer mutações genéticas. Contudo, para a maioria dos especialistas, estes problemas são plenamente compensados pelas vantagens que apresenta. Além das diversas variedades de bioensaios para citocinas que existem, todos estes se baseiam na capacidade de a proteína induzir uma atividade quantificável em células ou tecidos. A resposta celular pode adotar uma variedade de formas, embora geralmente consista na proliferação ou inibição da proliferação, expressão de marcadores celulares ou enzimas, citotoxicidade ou atividade antiviral (WADHWA et al., 1995).

1.4.2 Determinação da atividade de Interferons

Citocinas e fatores de crescimento polipeptídicos estimulam respostas biológicas mediante interações específicas com receptores presentes na superfície das células. Este contato desencadeia a ativação de vias de transdução de sinal no citoplasma da célula alvo culminando com a expressão de genes específicos. A família de citocinas dos interferons é tipicamente conhecida pela capacidade de induzir um ambiente intracelular inóspito para a replicação viral. A despeito das diferenças estruturais que ocorrem entre os membros da família e mesmo com a sinalização sendo induzida por diferentes classes de receptores, a família dos IFNs, de uma maneira geral, promove ação biológica ampla e similar em células sensíveis. Tais ações compreendem atividade antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora, as quais podem ser observadas em culturas celulares apropriadas e quantificadas quando a estimulação dose-dependente for observada. Historicamente, a atividade *in vitro* dos IFNs tem sido determinada através da capacidade destes de induzir um estado antiviral em linhagens de células sensíveis. Assim, ensaios antivirais foram desenvolvidos para gerar resposta dose-dependente, o que viabiliza o cálculo da potência relativa de uma determinada preparação de IFN. A elucidação de outras atividades induzidas pelos IFNs levaram a amplificação dos tipos de bioensaios aplicáveis na

determinação da potência. Os ensaios de proliferação, onde é observada a inibição dose-dependente do crescimento de uma determinada linhagem celular em decorrência ao tratamento com as citocinas, são testes preconizados atualmente. Ainda, a identificação de proteínas que são induzidas especificamente em decorrência ao estímulo com IFNs, levaram a criação de bioensaios mais específicos. Este processo de indução protéica específica foi especulado para o desenvolvimento do ensaio do gene repórter, no qual se utiliza uma região promotora capaz de ser induzida especificamente por IFN, atrelada a um gene que codifica uma proteína de fácil quantificação, ex. fosfatase alcalina ou luciferase. Este gene, por sua vez é inserido via plasmídeo em linhagens celulares sensíveis aos IFNs. A expressão do gene transfectado é dependente da concentração de IFN e a leitura do ensaio é baseada na atividade enzimática que será diretamente proporcional a potência. A quantificação de intermediários fosforilados induzidos em vias de transdução de sinais decorrentes da estimulação por IFNs, também pode contribuir para o desenvolvimento de novos bioensaios (MEAGER, 2006).

1.4.2.1 Ensaio antiviral

O ensaio antiviral, executado em culturas celulares, permite a quantificação da atividade inibitória do IFN seja na propagação de um vírus ou no processo replicativo deste. A quantificação pode ser feita sob vários aspectos, dentre eles, mediante a redução da produção de partículas virais, do efeito citopático viral, da formação de placas virais, de proteínas virais, da síntese de RNA do vírus, etc. (GROSSBERG & SEDMAK, 1984; LEWIS, 1987; MEAGER, 1987; MEAGER, 2003). O ensaio de redução da produção de partículas virais, que envolve formação de unidades formadoras de placas a partir do vírus pró-gene (partículas virais formadas após a infecção inicial) obtido de células tratadas com cada diluição seriada de IFN, pode ser informativo e quantitativo, porém demanda tempo e custo demasiados (MEAGER, 2003). A redução da expressão de antígenos virais pode também ser quantificada por imunoensaio (JULKUNEN, 1982; HERMODSSON, 1984). Contudo, por razões práticas os ensaios antivirais atuais são calcados na capacidade que o IFN possui de proteger células contra o

efeito citopático de um vírus lítico sobre uma faixa de concentração de IFN (MEAGER, 2003). Este tipo de ensaio antiviral é amplamente conhecido como ensaio de redução do efeito citopático e é sugerido pela farmacopéia européia na determinação da potência relativa destas citocinas (*COUNCIL OF EUROPE*, 2008-b).

As etapas básicas para a execução de um ensaio de redução do efeito citopático são:

- 1) Estimular quantidade suficiente de uma linhagem de célula aderente com diluições seriadas da preparação do IFN (padrão e preparações teste).
- 2) Desafiar as células com um vírus citolítico até efeito citopático máximo.
- 3) Efetuar coloração com corante vital para determinar os níveis de efeito citopático de acordo com a concentração de IFN e ler espectrofotometricamente.
- 4) As leituras são plotadas graficamente em curvas dose-resposta para a determinação da potência do IFN.

Uma grande variedade de células de mamíferos pode ser utilizada em cultura na execução deste ensaio, como células diplóides de fibroblasto (MRC-5, HFF), carcinoma pulmonar (A549), carcinoma hepático (Hep-G2), carcinoma pancreático (PANC-1, MIA-PA-CA-2), glioblastoma (2D9), células Hep-2C, etc., sendo as últimas demonstradas como relativamente sensíveis ao IFN alfa-2b (MEAGER, 2005). O vírus empregado nos ensaios de redução do efeito citopático deve ser capaz de produzir efeito lítico nas células desafiadas e vírus como o vírus da estomatite vesicular (VSV), vírus da encefalomiocardite murina (EMCV), vírus Mengo (MV), vírus *Sindbis* (SINV) e o vírus da Floresta de *Semliki* (SFV) são os mais utilizados na realização destes ensaios.

A maneira com a qual as células respondem aos IFNs varia assim como também varia a susceptibilidade das células à infecção viral. Esta observação levou os pesquisadores a gerar combinações apropriadas entre vírus e linhagens celulares para o desenvolvimento destes ensaios (Quadro 1.2) (GROSSBERG, 1984; MEAGER, 1987; MEAGER, 2002; MEAGER, 2003).

Uma vez selecionados e definidos os elementos biológicos do ensaio, a potencia de uma preparação de IFN pode ser estimada pela comparação de seu efeito biológico protetor contra infecção viral, com o mesmo efeito proveniente de uma preparação de referência previamente calibrada em unidades internacionais.

Em geral os dados são analisados em modelos matemáticos de linhas paralelas, sendo preferencial o modelo logístico de quatro parâmetros devido a sua maior precisão. A análise de variância (ANOVA) se faz necessária para examinar a regressão, a linearidade e o paralelismo entre as curvas do padrão e da amostra estudada. A regressão, que é a inferência da relação entre variáveis dependentes (variável de resposta) com as variáveis independentes (variáveis calculadas durante a análise) deve ser estatisticamente significativa e não devem ser observados desvios estatisticamente significativos da linearidade (comportamento unidirecional lógico entre o estímulo e a resposta observada) e do paralelismo que é definido pela igualdade entre as inclinações das curvas entre o padrão e a amostra, dentro de um nível de aceitabilidade (*COUNCIL OF EUROPE*, 2008-a).

Quadro 2. Algumas combinações entre vírus e linhagens celulares para ensaios de redução do efeito citopático viral.

Linhagem celular	Vírus
Carcinoma pulmonar humano (A549)	VSV ou EMCV
Linhagem amniótica humana (WISH)	VSV, EMCV, SFV ou SINV
Carcinoma hepático humano (HepG2)	VSV ou EMCV
Carcinoma de laringe humano (Hep2)	VSV, EMCV ou MV
Fibroblasto diplóide humano (MRC5, FS4)	VSV, EMCV ou MV
Linhagem de glioblastoma humano (2D9)	EMCV
Linhagem de glioblastoma humano (LN319)	EMCV
Fibroblasto de camundongo (L929)	VSV ou EMCV

Fonte: MEAGER, 2006.

OBJETIVO & JUSTIFICATIVA

2 OBJETIVOS & JUSTIFICATIVA

Com a crescente demanda do controle da qualidade de biofármacos, como o IFN alfa em decorrência principal da quantidade de casos de Hepatite C, o presente trabalho tem como objetivo geral padronizar um ensaio antiviral para Interferon alfa-2b, utilizando células Hep-2C e vírus Mengo e estudar a atividade biológica do IFN alfa-2b nestas células para aplicação em ensaios de determinação de potência relativa.

Além da atividade antiviral, os IFNs também possuem atividade antiproliferativa podendo gerar interferência no ensaio antiviral ressaltando a importância do estudo desta atividade na combinação vírus/célula adotada.

Como os compêndios nacionais são desprovidos de bioensaios para esta finalidade, torna-se imprescindível o estudo e o aprimoramento nesta categoria de ensaios. De forma mais específica, objetivamos:

- Comparar dois procedimentos colorimétricos (MTT e cristal violeta) em células Hep-2C;
- Avaliar efeito do IFN alfa-2b na viabilidade de células Hep-2C;
- Estudar a distribuição do ciclo celular de células Hep-2C estimuladas com IFN alfa-2b;
- Padronizar um ensaio de redução do efeito citopático viral utilizando vírus Mengo e células Hep-2C;
- Avaliar distúrbios na viabilidade destas células causados pelo IFN alfa-2b nas condições do ensaio antiviral;
- Empregar ensaio antiviral na determinação da potência relativa de uma preparação comercial de IFN alfa-2b;
- Estudar a relação entre células Hep-2C estimuladas com IFN alfa-2b e a quantidade de pSTAT1 induzida utilizando método de citometria de fluxo.

MATERIAIS & MÉTODOS

3 MATERIAIS & MÉTODOS

3.1 Cultivo de células

3.1.1 Manutenção das linhagens

Utilizamos uma linhagem de célula epitelial derivada de carcinoma laríngeo humano (Hep-2C) que foi obtida da ECACC (*European Collection of Cell Cultures* - nº de catálogo 85020207) e uma linhagem de célula de fibroblasto de camundongo (L929 – ATCC - *American Type Culture Collection* - código de catálogo CCL-1) a qual foi gentilmente cedida pelo Instituto Butantan (São Paulo, Brasil). Os trabalhos utilizando cultivos celulares foram desenvolvidos no Laboratório do Setor de Cultura de Células do Departamento de Imunologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

A partir dos estoques conservados em nitrogênio líquido, as linhagens celulares foram cultivadas em estufa umidificada a $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂, utilizando meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Sigma, D7777) suplementado com glutamina 2mM (Sigma, G8540), NaHCO₃ 26mM (Sigma, S5761), 10% de SFB (soro fetal bovino - *Gibco® Invitrogen Corporation*, Nova York, Estados Unidos) e antibióticos: anfotericina B 2,5 µg/ml (Sigma, 46006); estreptomicina 100 µg/ml (Sigma, S9137); penicilina G 60 µg/ml (Sigma, P3032). O meio de cultura utilizado para cultivar as células L929 também foi suplementado com aminoácidos não-essenciais 0,01 mM (Sigma, M7145). As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura de células de 75 ou 175 cm² com volumes de meio de aproximadamente 20 e 40 ml, respectivamente. O meio de cultura foi trocado sempre no dia após o repique e, posteriormente, 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 acompanham o crescimento celular e a morfologia apropriada para cada linhagem. A verificação da ausência de contaminações por

micoplasma foi feita logo antes do congelamento das linhagens através da coloração de DNA pelo Laboratório de Cultura Células.

A partir de garrafas de cultivo celular contendo monocamadas celulares em confluência ou semiconfluência, foram obtidas as suspensões celulares para o próximo repique ou para os experimentos.

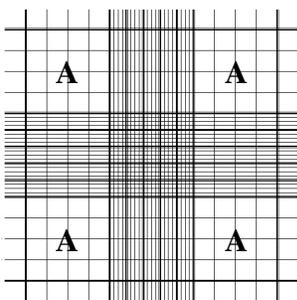
Toda a manipulação de células submetidas ao cultivo foi realizada em cabine de segurança biológica. Antes de cada procedimento, as cabines foram postas em funcionamento por 20 minutos para purificação da atmosfera interna e mais 20 minutos com a lâmpada de ultravioleta acionada na presença do material utilizado na técnica. Antes da entrada de qualquer material na cabine, estes foram rinsados com gaze embebida em álcool 70%.

3.1.2 Preparo da suspensão celular

Para preparar a suspensão de células, inicialmente o meio de cultura das garrafas foi desprezado utilizando pipeta sorológica. 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 etilenodiamino tetraacético (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 $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂ e a individualização das células foi acompanhada ao microscópio óptico invertido. Após a segregação das células, foi adicionado DMEM com 10% SFB em igual volume ao adicionado de tripsina/EDTA na etapa anterior. O volume contido nos frascos foi homogeneizado extensivamente com auxílio de uma pipeta sorológica para remoção de possíveis agregados celulares. Uma pequena alíquota foi coletada em tubo *ependorf*, destinada à determinação da concentração e viabilidade celular.

3.1.3 Determinação de concentração da suspensão celular

Após o preparo da suspensão celular, a estimativa da concentração e do percentual de células viáveis foi realizada tanto para os ensaios biológicos, como para os procedimentos de repique das linhagens. O cálculo foi feito mediante contagem das células em câmara de Neubauer, previamente diluídas em azul de tripan (Sigma, T8154). As células capazes de captar o corante são consideradas inviáveis devido à perda de seletividade da membrana, permitindo, desta forma, 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 (Esquema 3.1). Como o volume de cada quadrante é de $0,1 \text{ mm}^3$, ao multiplicar a média dos quadrantes pelo fator de diluição e pelo fator da câmara de Neubauer (10^4), 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.



Esquema 1. Representação de câmara de Neubauer. **A** - quadrantes utilizados na contagem de células para determinação da concentração de suspensão celular. Modificado de www.hausserscientific.com.

3.2 Manipulação viral

Para os experimentos foi utilizada 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.

3.2.1 Replicação do vírus Mengo

Para a replicação do vírus Mengo, foram utilizadas duas garrafas de cultura de células de 175 cm² contendo células de fibroblasto de camundongo (L929) em confluência. Uma delas (garrafa controle) foi utilizada como controle de células tendo seu meio de cultura descartado e então adicionados 100 ml de meio DMEM 2% SFB. O frasco foi posteriormente incubado por 20 h em estufa umidificada a 37 ± 0,5 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Da segunda garrafa (garrafa de replicação), o meio de cultura presente foi descartado e foram executadas três lavagens com 10 ml de PBS (tampão fosfato salino contendo NaCl 0,85%, K₂HPO₄ 0,0135% e Na₂HPO₄ dodecahidratado 0,204% em água deionizada) pH 7,4. Após as lavagens, foi adicionado ao frasco 1 ml da cepa do vírus Mengo, em seguida fazendo movimentos suaves por cerca de um minuto, para garantir 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 ± 0,5 °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.

Após o período de incubação, foi certificada a integridade das células na garrafa controle e o efeito citopático viral na garrafa de replicação foi evidenciado pela presença de mudanças morfológicas (morfologia alargada e danos nas membranas), mortes e detritos celulares.

3.2.2 Manipulação e replicação do vírus Mengo

Toda a etapa de manipulação e purificação do vírus Mengo foi feita em banho de gelo. O Meio de cultura da garrafa de replicação foi transferido para um tubo de centrífuga (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 centrífuga (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 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi centrifugado a 550 g por dez minutos sob temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante foi adicionado ao tubo B. Após homogeneização do sobrenadante, este foi filtrado por sistema de filtração a vácuo em membrana de $0,10\text{ }\mu\text{m}$. A solução resultante foi fracionada em alíquotas de 1 ml em criotubos e armazenada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Toda a manipulação do vírus Mengo foi realizada em cabine de segurança biológica com os mesmos cuidados descritos no item 3.1.1. A suspensão viral foi sempre mantida em banho de gelo para minimizar perdas de título.

3.2.3 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 Hep-2C com diluições decimais seriadas da suspensão viral obtida na etapa da produção em um volume final de 180 μl . As diluições foram feitas de 10^{-1} a 10^{-10} em meio de cultura DMEM 2% SFB em seis réplicas para cada concentração (Esquema 3.2). 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 4.0 (EDQM, 2008).

3.3 Métodos colorimétricos para determinação de viabilidade celular

Dois métodos colorimétricos, MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo - Sigma, M2128) e cristal violeta (Sigma, HT90-1), foram selecionados para comparação. O teste com MTT baseia-se na redução do sal tetrazolato pela enzima hidrogenase succínica presente na mitocôndria das células, as quais adquirem uma coloração violácea que é medida por

espectrofotometria. O corante cristal violeta também é utilizado para determinar a viabilidade celular devido a sua habilidade de ligação ao DNA. Após sua eluição, este também pode ser mensurado espectrofotometricamente.

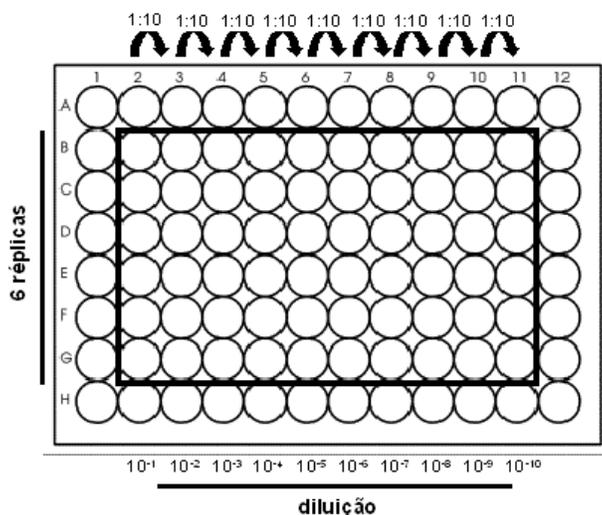
3.3.1 MTT

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 solução de MTT foi fracionada em tubos *ependorf* os quais foram armazenados a -20 °C cobertos com papel alumínio apresentando estabilidade por seis meses, conforme especificações do fabricante.

Para o procedimento colorimétrico, um protocolo foi padronizado seguindo Mosmann (1983). Placas de 96 poços a serem coradas foram previamente lavadas com 100 µl de PBS pH 7,4. Após a lavagem, 100 µl de PBS foram adicionados aos poços bem como 10 µl da solução de MTT 5 mg/ml, previamente preparada. Após 4 h de incubação das células com o sal tetrazolato em estufa umidificada a $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂, 100 µl de uma solução 0,04N HCl em isopropanol foram adicionados para solubilizar os cristais formados na 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).

3.3.2 Cristal violeta

Para efetuar a coloração com cristal violeta em placas de 96 poços, inicialmente o meio de cultura foi desprezado e 100 µl da solução de coloração de cristal violeta (5% cristal violeta, 1,7% NaCl, 3,3% paraformaldeído em 33,3% etanol) foram adicionados aos poços e mantidos por três minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas por dois minutos por imersão em água corrente, secas e posteriormente eluídas com 100 µl de SDS 1%. Após uma hora a temperatura ambiente, as absorbâncias foram medidas a 570 nm em espectrofotômetro (Stat Fax, Versa Max).

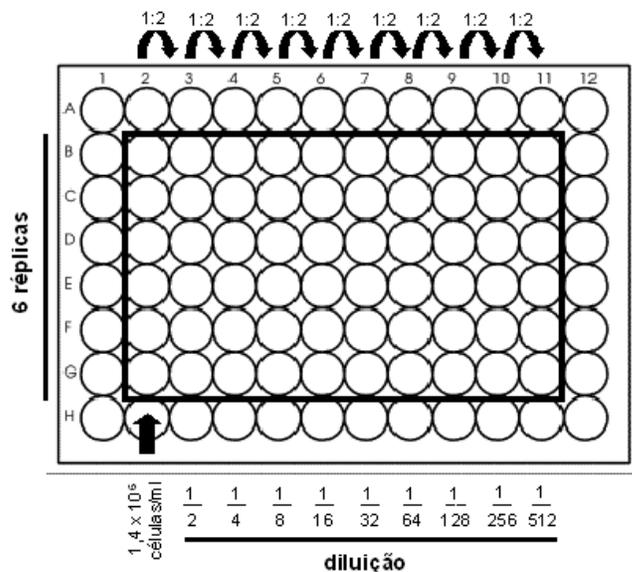


Esquema 2. Organização de placa de 96 poços para a determinação do título da suspensão de vírus Mengo. Em uma placa contendo células Hep-2C em confluência nos 60 poços centrais, foram adicionados 180 μ l de DMEM 2% SFB. Foram adicionados 20 μ l da suspensão viral produzida nos poços 2B até 2G e 20 μ l desta coluna foram passados serialmente até a coluna 11, sob fator de diluição 10. As placas foram incubadas por 18-20 horas a $37 \pm 0,5$ °C em 5% de atmosfera de CO₂ sob 95% de umidade e posteriormente foram lidas ao microscópio óptico invertido. Poços contendo efeito citopático viral foram classificados como positivos e o título do vírus foi estimado usando transformação de probitos no programa Combistats® v 4.0.

3.3.3 Comparação entre os métodos colorimétricos: Cristal violeta e MTT

Em placa de 96 poços, foi semeada suspensão celular de Hep-2C em seis réplicas a uma concentração de $1,4 \times 10^6$ células/ml (Esquema 3.3). A suspensão foi diluída nove vezes em série sob fator 2 de forma que o volume final para cada concentração fosse 100 μ l. Posteriormente, todos os poços contendo células foram preenchidos com 100 μ l adicionais de DMEM 10 % SFB e os poços periféricos com 200 μ l. Após 24 horas de incubação em estufa umidificada a $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂, cada método de coloração foi realizado. Um total de 6 placas foram analisadas sendo 3 para cada procedimento de coloração que foram efetuados independentemente. Como o processo de determinação dos parâmetros envolvidos em uma relação linear é relativamente simples, para avaliar a precisão dos métodos colorimétricos, os dados de densidade óptica (DO) após 24 h e número de células incubadas por poço foram transformados e *plotados*

como $(DO \text{ após } 24 \text{ h})^{-1} \times (\log (\text{número de células incubadas} / \text{poço}))^{-1}$. Esta transformação dos eixos permite a linearização dos dados e a comparação dos coeficientes de regressão linear entre os procedimentos (MC CULLOCH, 2000). Os valores aberrantes foram detectados e removidos pelo método de Grubbs (GRUBBS, 1969) e os dados foram analisados com o auxílio do programa *Microsoft Excel® 2007*.



Esquema 3. Distribuição de diluições da suspensão celular em placa de 96 poços para os ensaios de comparação entre os métodos de coloração com MTT e cristal violeta. A suspensão celular de Hep-2C foi semeada na coluna 2B até 2G e diluída serialmente por 9 vezes até a coluna 11 com fator de diluição igual a 2. Posteriormente, a cada poço contendo 100 μ l da suspensão de células, foram adicionados 100 μ l de DMEM 10% SFB. Poços periféricos foram preenchidos com 200 μ l do meio de cultura utilizado. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa umidificada a $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂ e foram posteriormente coradas usando MTT ou cristal violeta.

3.4 Preparo do padrão e amostras de interferon alfa-2b

O padrão internacional de interferon alfa humano recombinante-2b (95/566) obtido do *National Institute of Biological Standards and Control* (NIBSC, Reino Unido) contendo 70000 UI/frasco e amostras proveniente do Produtor 1 (3000000 UI/frasco) e Produtor 2 (10000000 UI/frasco) foram reconstituídos em 1 ml de

água destilada estéril, diluídos a 1000 UI/ml, fracionados em alíquotas de 0,5 ml e armazenados a -70 °C até o momento da utilização.

3.5 Ensaio de viabilidade celular

Para o ensaio de viabilidade celular, 10^4 células Hep-2C em 200 µl de DMEM 10% SFB contendo ou não o padrão internacional do IFN alfa-2b no espectro de diluição decimal entre 1000 e 0,01 UI/ml, foram adicionadas a placas de 96 poços em triplicata e incubadas por quatro dias em estufa umidificada a $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, o meio foi removido das placas, os poços foram lavados com 100 µl de tampão fosfato salino (PBS) e o procedimento colorimétrico utilizando MTT foi empregado. Dados foram coletados de três experimentos independentes e analisados no programa *Microsoft Excel*® 2007. Os valores foram normalizados em percentual relativo ao controle de células, onde o crescimento celular ocorreu na ausência de IFN alfa-2b. Diferenças significativas foram analisadas utilizando o teste *t* de *Student* não pareado com índice de confiança de 95%.

3.6 Ciclo celular

3.6.1 Preparo da solução de ribonuclease A livre de DNase

Inicialmente, uma solução mãe de ribonuclease A (Sigma, R5000) foi preparada a uma concentração de 10 mM em tampão de acetato de sódio pH 5,4. A solução foi transferida para um tubo termo-resistente com tampa e foi submetida a 15 minutos de aquecimento em água fervente. Em um potenciômetro, a solução mãe foi mantida sob agitação e o pH foi corrigido a 7,4 gotejando solução tampão TRIS/HCl 1M. A partir da solução mãe, a solução de Ribonuclease A foi diluída a 100 µg/ml em água destilada e fracionada em tubos *ependorf* em alíquotas de 1 ml. O material foi armazenado a -20 °C apresentando estabilidade por seis meses, conforme recomendações do fabricante.

3.6.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

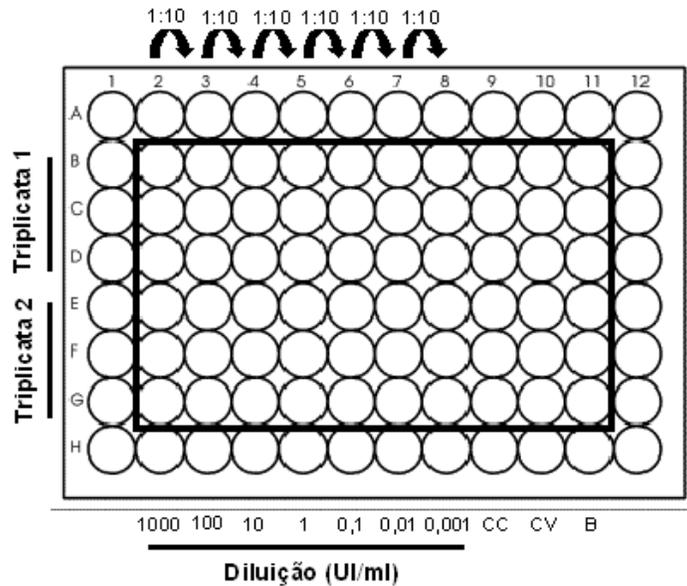
Em placas de 96 poços, 6×10^4 células Hep-2C foram semeadas em contato ou não com diferentes concentrações de IFN alfa-2b ou com colchicina $1,5 \mu\text{M}$ em um volume final de $200 \mu\text{l}$ por 24 horas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 . Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido das placas e os poços foram lavados duas vezes com $100 \mu\text{l}$ de PBS pH 7,4. Após a lavagem, $100 \mu\text{l}$ da solução de tripsina 0,05% p/v adicionado de EDTA 0,02% p/v foram adicionados e as células foram incubadas por três minutos em estufa umidificada a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ com atmosfera de 5% de CO_2 . Com agitação manual cautelosa, a individualização das células foi acompanhada mediante observação ao microscópio óptico invertido. Ao término da completa individualização celular, $100 \mu\text{l}$ de DMEM 10% SFB foram adicionados aos poços que foram posteriormente homogeneizados com pipetador automático multicanal. Cada conjunto de réplica estimulada com a mesma concentração de interferon foi transferida para tubos FACS de 5 ml e centrifugados a 500 g por dez minutos. O sobrenadante foi removido e um ml de álcool 70%, previamente mantido a 4°C , foi adicionado aos tubos que foram mantidos em banho de gelo por 45 minutos. Após a fixação e permeabilização, as células foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4 mediante centrifugação a 550 g por dez minutos. Um volume de $100 \mu\text{l}$ da solução de ribonuclease A livre de DNase, previamente preparada, foi adicionado às amostras que foram incubadas por dez minutos ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Para analisar o conteúdo de DNA, foram adicionados aos tubos, $400 \mu\text{l}$ de uma solução de iodeto de propídio (Sigma, P4864) $50 \mu\text{g/ml}$ diluída em PBS, aproximadamente cinco minutos antes da leitura em aparelho de citometria de fluxo *BD FACSCalibur*. A fluorescência vermelha do iodeto de propídio foi mensurada a 585 nm (FL2). O programa WinMDI v2.9 foi utilizado para determinar o percentual correspondente ao somatório das fases S e G2 do ciclo celular. Agregados celulares foram desconsiderados das estimativas. Um total de três experimentos foi realizado de forma independente e as diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste *t* de *Student* não-pareado com índice de confiança de 95%.

3.7 Ensaio antiviral

Para determinar a potência dos interferons testados com relação à atividade antiviral, um protocolo foi padronizado com base no ensaio para interferons descrito na Farmacopéia Européia (*COUNCIL OF EUROPE*, 2008-b).

Visando a padronização do ensaio antiviral, o protocolo de teste desenvolvido foi repetido por 32 vezes em nove dias diferentes. A etapa seguinte consistiu da análise de uma amostra comercial do IFN alfa-2b frente ao padrão internacional. Um total de três ensaios independentes foram realizados, juntamente com a titulação do vírus Mengo para cada análise.

Os testes foram realizados utilizando os 60 poços centrais de placas de 96 poços de fundo chato, onde 6×10^4 células Hep-2C foram incubadas em um volume de 200 μ l de DMEM 10% SFB por um período de 24 h em estufa umidificada a $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂. Para evitar respostas desiguais e o favorecimento do surgimento de valores aberrantes, conforme sugerido por Meager e colaboradores (2002), os poços periféricos não foram semeados sendo somente preenchidos com 200 μ l do meio de cultura utilizado. Após a incubação, o meio foi removido das placas e 100 μ l de 7 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 replicas de 3 para cada concentração. Um volume adicional de 100 μ l de meio foi acrescentado totalizando um volume final de 200 μ l por poço. Uma coluna foi destinada ao controle de células e outra para o controle de vírus, onde somente 200 μ l de DMEM 10% SFB foram acrescentados. As placas foram novamente incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após 24 h, o meio de cultura foi removido e as células foram infectadas com 180 μ l 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 de célula 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 (Esquema 3.4).



Esquema 4. Organização de placa de 96 poços para os ensaios de potência do IFN alfa 2b, baseado na redução do efeito citopático. As fileiras 2 a 8 são utilizadas para o espectro de diluição do IFN que vai de 1000 a 0,001 UI. Fileiras 9, 10 e 11 são destinadas ao controle de células (CC), controle de vírus (CV) e ao branco (B), respectivamente. O desafio foi efetuado com o vírus Mengo e o procedimento com MTT foi utilizado como método colorimétrico. Dados foram analisados com auxílio do programa Combistats® v 4.0 e SPC explorer RT v.5.21.

Para comparar as respostas entre as placas, os dados foram normalizados, Conforme Dellgren e colaboradores (2009), utilizando os controles de célula e vírus (Equação 3.1). Posteriormente, o modelo logístico de quatro parâmetros (Equação 3.2) foi empregado para calcular a concentração de IFN alfa-2b que produzia 50% da inibição do efeito citopático (ED_{50}), os intervalos de confiança de 95% e o coeficiente de correlação. Os cálculos foram feitos utilizando o programa Combistats® v4.0. Para determinar a faixa de variação dos valores de ED_{50} durante a etapa de implementação do ensaio antiviral, estes foram *plotados* em gráfico de controle no programa SPC explorer RT v.5.21.

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

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

Equação 1. Expressão empregada na normalização dos dados obtidos nos ensaios antivirais.

$$SNC = E. \text{mín} + \frac{E. \text{máx} - E. \text{mín}}{1 + \left(\frac{[dose]}{ED_{50}} \right)^{\text{inclinação}}}$$

E. mín = efeito mínimo
 E. máx = efeito máximo
 [dose] = dose de IFN alfa 2b
 ED₅₀ = dose de IFN capaz de inibir 50% do efeito citopático causado pelo vírus Mengo
 inclinação = inclinação da curva dose-resposta
 SNC = sobrevivência normalizada de células em relação ao controle

Equação 2. Modelo logístico de 4 parâmetros utilizado na determinação da ED₅₀ nos ensaios antivirais.

3.7.1 Análise de interferência no ensaio antiviral

Com a finalidade de avaliar o grau de interferência causado pelo IFN alfa-2b na viabilidade celular durante ensaios antivirais, um teste foi realizado com células Hep-2C tratadas com a referência internacional de interferon alfa-2b, desafiadas ou não com vírus Mengo. Após confluência e tratamento com IFN alfa-2b por 24 horas em estufa umidificada a $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂, as células foram mantidas em contato com 180 µl de DMEM 2% SFB ou DMEM 2% SFB na presença de vírus (MOI igual a 10) por 18-20 horas sob as mesmas condições de incubação. Cada tratamento foi feito em triplicata e em três ensaios diferentes. A viabilidade celular foi estimada pelo procedimento com MTT e os dados foram analisados com o auxílio do programa *Graph Pad Prism®* v.5.01 e *Microsoft Excel®* 2007. Diferenças significativas foram calculadas pelo teste *t de Student* não pareado (índice de confiança de 95%).

3.8 Marcação intracelular de STAT1 fosforilado (pSTAT1)

Para o procedimento de marcação intracelular de pSTAT1, um protocolo foi desenvolvido com base em Krutzik & Nolan (2003). Alíquotas de 1 ml de suspensão celular de Hep-2C a 10^6 células/ml em meio DMEM 10% SFB foram pré-incubadas por dez minutos em estufa umidificada a $37 \pm 0,5$ °C com atmosfera de 5% de CO₂. As células foram então estimuladas com IFN alfa-2b em diferentes concentrações e incubadas nas mesmas condições anteriores. 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 decantado e 1 ml de metanol a 4 °C foi adicionado aos tubos que foram então mantidos em banho de gelo por dez minutos. Após a permeabilização, 3 ml de meio de marcação (0,3% albumina sérica bovina + 0,02% NaN₃ em PBS) foram adicionados aos tubos e centrifugados nas mesmas condições descritas acima. A etapa de lavagem foi executada duas vezes. As células foram resuspendidas em 5 µl de Alexa Fluor® 488 anti-pSTAT1 (*BD™ Phosflow*, pY701), para a marcação intracelular de pSTAT1, e incubadas por mais 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas com 3 ml de meio de marcação e analisadas em aparelho de citometria de fluxo *BD FACSCalibur*.

3.8.1 Cinética da ativação de STAT1

Para definir o melhor tempo de estimulação com o IFN alfa-2b, um estudo de cinética da marcação intracelular de pSTAT1 foi realizado utilizando uma dose fixa de 500 UI/ml preparação de referência do IFN alfa-2b e variando o tempo de estimulação de 0 a 80 minutos intercalado em 20 minutos. O protocolo de marcação foi efetuado como descrito anteriormente e as amostras foram lidas em aparelho de citometria de fluxo *BD FACSCalibur*. Dados foram analisados com o auxílio do programa WinMDI v2.9.

3.8.2 Relação entre a dose de IFN alfa-2b e pSTAT1

A relação entre a dose e a quantidade de pSTAT1 foi estudada utilizando doses de 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 UI/ml da preparação de referência do IFN alfa-2b, em um tempo de estimulação de 40 minutos. O protocolo de marcação foi efetuado como descrito anteriormente e as amostras foram lidas em aparelho de citometria de fluxo *BD FACSCalibur*. Dados foram analisados com o auxílio do programa WinMDI v2.9.

3.8.3 Determinação da potência relativa mediante marcação intracelular de pSTAT1

Para determinar a potência relativa das preparações de IFN alfa-2b de dois produtos comerciais, células Hep-2C foram estimuladas com 6 diluições seriadas sob fator 2 da citocina, correspondendo a doses de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 UI/ml. Após estimulação de 40 minutos com o IFN alfa-2b, foi empregado o protocolo supracitado para marcação intracelular de pSTAT1 e as amostras foram lidas em aparelho de citometria de fluxo *BD FACSCalibur*. Os resultados foram analisados com o programa WinMDI v2.9 e a potência relativa foi estimada no programa Combistats® v4.0 utilizando modelo logístico de quatro parâmetros. Valores como efeito mínimo (E. mín.) e máximo (E. máx.) na marcação de pSTAT1, dose de IFN alfa-2b ([dose]), inclinação da curva dose-resposta (inclinação) e o percentual de marcação de pSTAT1 (pSTAT1(%)) foram estimados na determinação da dose observada de IFN alfa-2b que causava 50% do efeito máximo na ativação de STAT1 (DEpstat1₅₀), conforme equação (modelo logístico de quatro parâmetros) a seguir:

$$\text{pSTAT1(\%)} = \text{E. mín.} + (\text{E. Max.} - \text{E. mín.}) / (1 + 10^{((\text{LogDEpSTAT1}_{50} - [\text{dose}]) * \text{inclinação}))}$$

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Procedimentos colorimétricos: cristal violeta e MTT

Com o objetivo de definir o procedimento colorimétrico mais apropriado para a determinação da viabilidade celular de células Hep-2C neste estudo, dois métodos colorimétricos (MTT e cristal violeta) foram eleitos para comparação. Os dados de comparação dos dois procedimentos colorimétricos estão exibidos na Tabela 4.1. No procedimento com cristal violeta, a quantidade média de $1,37 \times 10^5$ células semeadas por poço, promoveu densidade óptica (DO) média a 570 nm igual a 2,12 em 24 horas, que foi 15,9% menor quando comparada com a diluição seguinte, no qual a DO média foi 2,52. A variação intra-ensaio para o procedimento com MTT foi de 6,67 % a 11,93 % e no procedimento com cristal violeta foi de 5,46 % a 8,51 %. A variação inter-ensaio observada foi de 18,15 % e 17,58 % utilizando MTT e cristal violeta, respectivamente (Tabela 4.2).

Após transformação dos dados para linearização, os coeficientes de regressão linear observados para o procedimento com MTT e cristal violeta foram 0,9931 e 0,9663, respectivamente, nos levando a considerar o método com MTT como o mais apropriado para os ensaios de determinação de viabilidade celular em células Hep-2C (Figura 4.1).

Tabela 1. Comparação entre os procedimentos usando MTT e cristal violeta para determinação de viabilidade celular em células Hep-2C.

	f. dil.	média do nº de células semeadas / poço	DO média \pm dp após 24 h
MTT	-	$1,44 \times 10^5$	$0,85 \pm 0,12$
	2	$7,20 \times 10^4$	$0,65 \pm 0,06$
	4	$3,60 \times 10^4$	$0,40 \pm 0,03$
	8	$1,80 \times 10^4$	$0,23 \pm 0,03$
	16	$9,00 \times 10^3$	$0,16 \pm 0,04$
	32	$4,50 \times 10^3$	$0,12 \pm 0,03$
	64	$2,25 \times 10^3$	$0,09 \pm 0,02$
	128	$1,13 \times 10^3$	$0,07 \pm 0,01$
	256	$5,63 \times 10^2$	$0,06 \pm 0,01$
	512	$2,81 \times 10^2$	$0,05 \pm 0,00$
Cristal violeta	-	$1,37 \times 10^5$	$2,12 \pm 0,27$
	2	$6,83 \times 10^4$	$2,52 \pm 0,25$
	4	$3,42 \times 10^4$	$2,06 \pm 0,24$
	8	$1,71 \times 10^4$	$1,35 \pm 0,27$
	16	$8,54 \times 10^3$	$0,75 \pm 0,17$
	32	$4,27 \times 10^3$	$0,46 \pm 0,11$
	64	$2,14 \times 10^3$	$0,32 \pm 0,09$
	128	$1,07 \times 10^3$	$0,25 \pm 0,05$
	256	$5,34 \times 10^2$	$0,22 \pm 0,05$
	512	$2,67 \times 10^2$	$0,19 \pm 0,03$

Dados relativos a três experimentos independentes onde são exibidos valores médios de quantidade de células semeadas por poço, fator de diluição (f. dil.) empregado, densidade óptica (DO) média observada após o período de incubação de 24 horas com seu respectivo desvio padrão (dp).

Tabela 2. Parâmetros de precisão entre procedimentos colorimétricos de MTT e cristal violeta.

	ensaio	CV% intra-ensaio	CV% inter-ensaio
MTT	1	8,66	18,15
	2	6,67	
	3	11,93	
Cristal violeta	1	5,99	17,58
	2	8,51	
	3	5,46	

São exibidos coeficientes de variação (CV%) intra- e inter- ensaio determinados em três experimentos independentes para cada método colorimétrico.

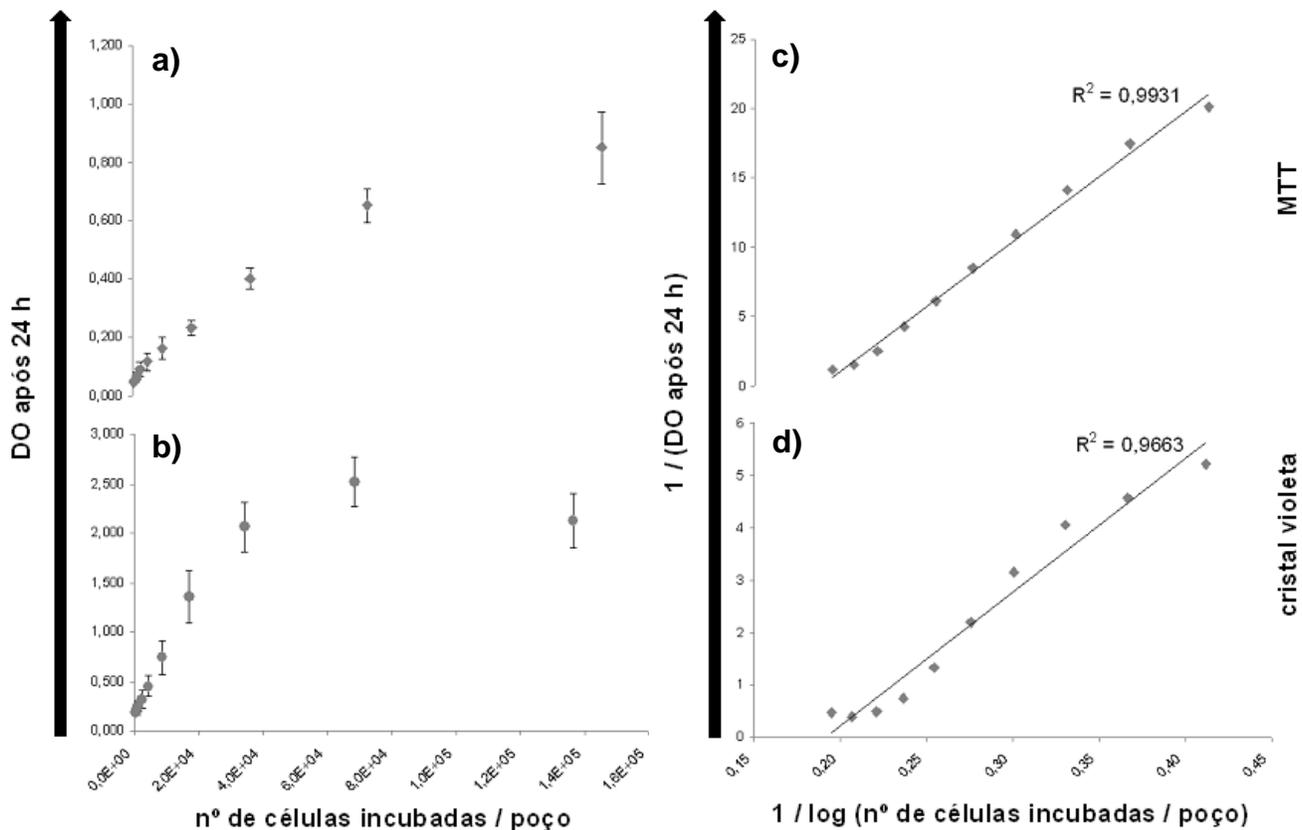


Figura 4. Comparação entre métodos de coloração com MTT e cristal violeta. Relação entre densidade óptica a 570 nm e o número de células incubadas por poço para MTT (a) e cristal violeta (b). c) e d) exibem os mesmos dados após as transformações dos eixos para linearização.

4.2 Ensaio de viabilidade celular

Visando investigar o impacto que o IFN alfa-2b produz no crescimento celular de linhagens Hep-2C, foi feita análise da viabilidade celular utilizando o método do MTT após exposição com o IFN em diversas concentrações. A Figura 4.2 ilustra os resultados provenientes do ensaio de viabilidade celular no qual os valores foram normalizados em relação ao controle de célula onde não houve tratamento com IFN alfa-2b. O percentual da viabilidade celular média observada quando as células Hep-2C foram semeadas por quatro dias juntamente com a referência internacional do IFN alfa-2b foi de $94,86 \pm 8,88$; $93,91 \pm 4,89$; $87,53 \pm 4,34$; $75,76 \pm 6,10$; $48,69 \pm 6,52$ e $4,68 \pm 2,26$ para concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10; 100 e

1000 UI/ml, respectivamente. Os resultados demonstram notada sensibilidade de linhagens Hep-2C com relação ao crescimento celular após exposição ao IFN alfa-2b nas condições experimentais em questão.

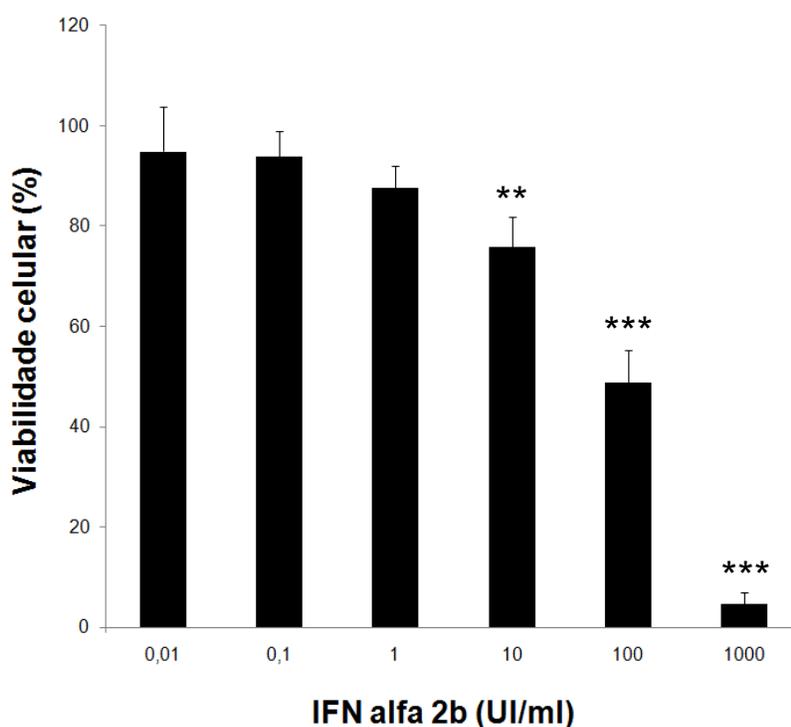


Figura 5. Viabilidade de células Hep-2C após tratamento com IFN alfa-2b pelo método do MTT. Dados exibindo o percentual médio e desvio padrão da viabilidade de células Hep-2C quando semeadas em contato com diferentes concentrações do padrão internacional do IFN alfa-2b e cultivadas por quatro dias. Os valores percentuais foram normalizados em relação ao controle de célula onde o crescimento celular ocorreu no mesmo intervalo de tempo e na ausência de IFN alfa-2b. Cada barra representa média e desvio padrão de três ensaios independentes. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ demonstram que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste *t* de Student não-pareado com índice de confiança de 95%.

4.3 Análise do ciclo celular

O estudo do ciclo celular foi feito com o objetivo de identificar possíveis variações na distribuição das fases do ciclo em linhagens celulares Hep-2C estimuladas com IFN alfa-2b. A análise revelou um aumento de células Hep-2C em fase S + G2 quando expostas ao IFN alfa-2b a 1000 UI/ml em comparação ao controle onde não houve exposição ao IFN. Foi lido um total de 10.000 eventos para cada tratamento e todos os valores percentuais foram estimados considerando apenas os eventos compreendidos em R1 e R2 para eliminação dos agregados celulares (Figura 4.3a e 4.3b).

Os percentuais médios correspondentes ao somatório das fases S + G2 do ciclo celular foram de $32,5 \pm 1,17$ para o controle de células e $32,1 \pm 1,38$; $32,3 \pm 0,76$; $34,7 \pm 2,99$; $38,6 \pm 3,88$ e $42,1 \pm 2,29$ para os tratamentos com IFN alfa-2b 0,1; 1; 10; 100 e 1000 UI/ml, respectivamente (Figura 4.4). O tratamento das células Hep-2C com colchicina 0,75 μ M promoveu um percentual de 73,6 % para o somatório das mesmas fases. A exposição das células Hep-2C a 1000 UI/ml de IFN alfa-2b promoveu um aumento significativo médio de 9,6 % da área do histograma correspondente ao somatório das fases S + G2 em relação às células não expostas ao IFN alfa-2b. Os dados mostram que nestas condições experimentais é observado arraste do ciclo celular de células Hep-2C provocado pela exposição ao IFN alfa-2b a 1000 UI/ml.

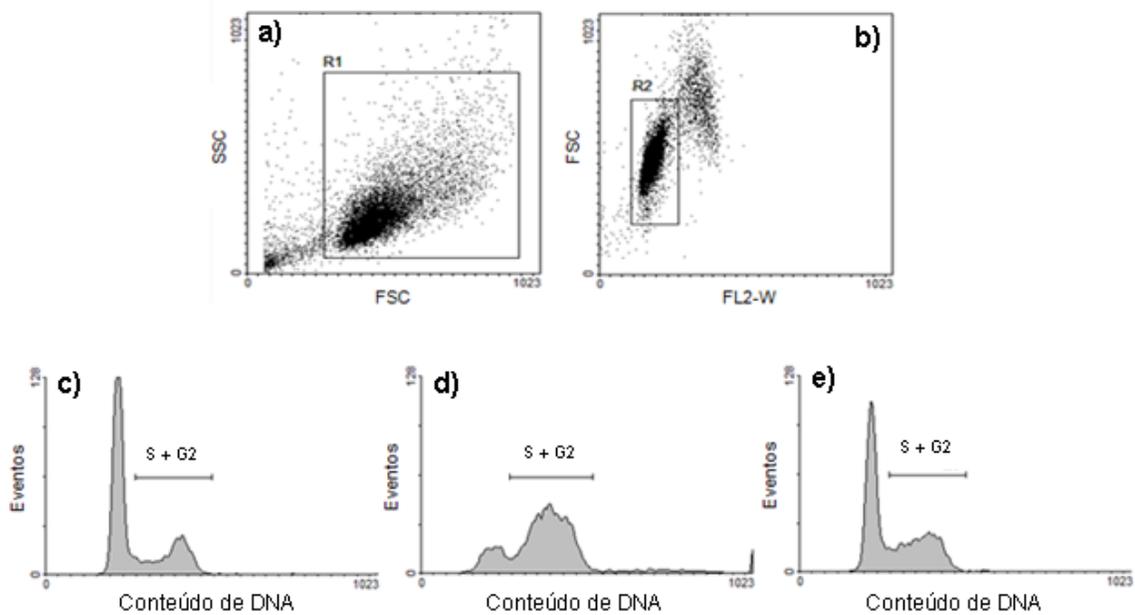


Figura 6. Análise do ciclo celular de células Hep-2C tratadas com IFN alfa-2b. Em **a)** e **b)** são exibidos gráficos de representação de pontos FSC (tamanho) x SSC (complexidade) e FL2-W (profundidade do sinal FL2) x FSC (tamanho), respectivamente. Os cálculos foram efetuados com base nos eventos comuns em R1 e R2. São exibidos histogramas originais de FACS para células Hep-2C não tratadas (**c)**), tratadas com colchicina 0,75 μM (**d)**) e tratadas com IFN alfa-2b 1000 UI/ml (**e)**). Dados representativos de três experimentos independentes.

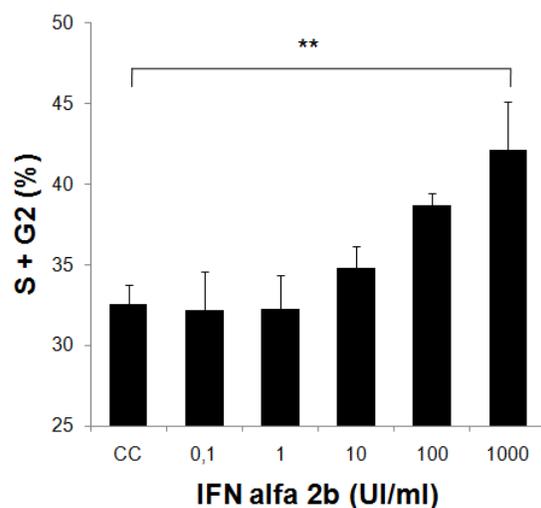


Figura 7. Valores percentuais correspondentes ao somatório das fases S e G2 do ciclo celular para os diferentes tratamentos de células Hep-2C com IFN alfa-2b. CC corresponde ao controle onde não houve exposição das células ao IFN. Dados obtidos de três experimentos independentes expressos em média e desvio padrão. ** $p < 0,01$ demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste *t* de *Student* não-pareado com índice de confiança de 95%.

4.4 Replicação e titulação do vírus Mengo

Na Figura 4.5 encontram-se fotomicrografias ilustrando o efeito citopático produzido pelo vírus Mengo em células L929 durante a etapa de produção da massa viral a ser utilizada nos experimentos posteriores. A titulação da suspensão viral produzida em células L929 foi feita em células Hep-2C por seis vezes em dois dias diferentes, sendo observado um título médio de $4,79 \pm 0,39$ logCCID₅₀/ml (Tabela 4.3).

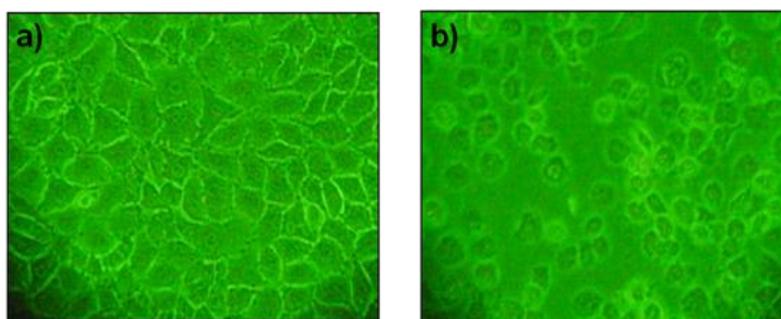


Figura 8. Células L929 na produção da suspensão do vírus Mengo. **a)** células L929 não infectadas (100x). **b)** efeito citopático do vírus Mengo em células L929 após 20 horas de incubação (100x).

Tabela 3. Titulação do Vírus Mengo em células Hep-2C.

	titulação	lim. inf.	log CCID ₅₀ /ml	lim. sup.
dia 1	1	4,45	4,85	5,21
	2	4,59	5,00	5,40
	3	5,03	5,34	5,64
dia 2	1	4,33	4,84	5,35
	2	3,83	4,34	4,85
	3	3,84	4,35	4,87
média \pm dp			4,79 \pm 0,39	

Títulos virais determinados por transformação de probitos acompanhados dos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança de 95%.

4.5 Ensaio antiviral

4.5.1 Padronização

Durante a etapa inicial de padronização do teste, o ensaio antiviral foi reproduzido 32 vezes em triplicata em nove dias diferentes usando o padrão internacional de IFN alfa-2b. Para determinar a faixa de variação dos valores de ED_{50} , estes foram *plotados* em gráfico de controle no programa SPC explorer RT v.5.21. O valor médio de ED_{50} observado foi de 2,386 UI/ml variando com dois desvios padrão entre 0,946 e 3,826 UI/ml (Figura 4.6). A Figura 4.7 ilustra os mesmos dados em uma segunda abordagem de análise onde todos os ensaios foram submetidos ao modelo logístico de quatro parâmetros. As medianas de sobrevivência normalizada de células (SNC) para 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 UI/ml de IFN foram de, respectivamente, 3,18; 5,52; 7,10; 19,07; 41,94; 50,82 e 47,39%, onde identificamos uma tendência à queda dos resultados de SNC para os dados relativos à concentração de 1000 UI/ml de IFN alfa-2b quando comparado com a diluição seguinte (100 UI/ml).

Durante a segunda abordagem, após aplicar o modelo logístico de quatro parâmetros para a determinação da ED_{50} , efeito máximo (E. máx.), efeito mínimo (E. mín.) e da inclinação da curva, foi necessário a remoção dos dados relativos a concentração de 1000 UI/ml de IFN alfa-2b dos cálculos para que a regressão e a linearidade fossem observadas com relevância estatística (índice de confiança de 95%). A ED_{50} observada foi igual a 2,829, compreendida em um intervalo de confiança de 95% ($CI_{95\%}$) com limite inferior e superior igual a 2,364 e 3,389, respectivamente. A inclinação da curva foi de 0,846 e o E. máx. e E. mín em relação a SNC foi, respectivamente, de 55,89% e 4,216%. O coeficiente de correlação observado foi de 0,9411 (Figura 4.7b). Como o ajuste ao modelo matemático empregado se deu com a desconsideração dos dados de SNC referentes à concentração de 1000 UI/ml de IFN alfa-2b, um experimento foi desenhado para avaliar distúrbios na viabilidade de células Hep-2C nas condições experimentais do ensaio antiviral.

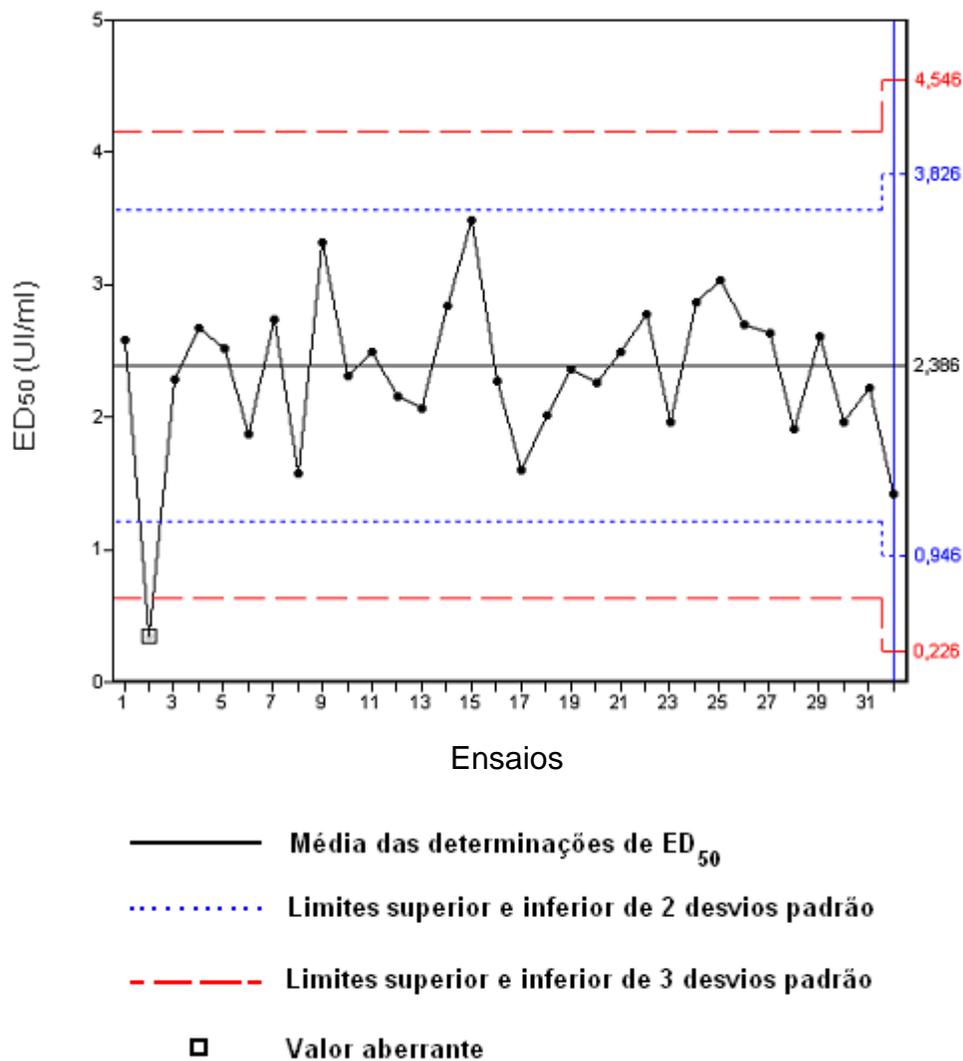


Figura 9. Gráfico de controle dos ensaios antivirais reproduzidos com o padrão internacional de IFN alfa-2b. São exibidos média e desvios padrão em UI/ml. Cada ponto representa a média de três determinações de ED₅₀.

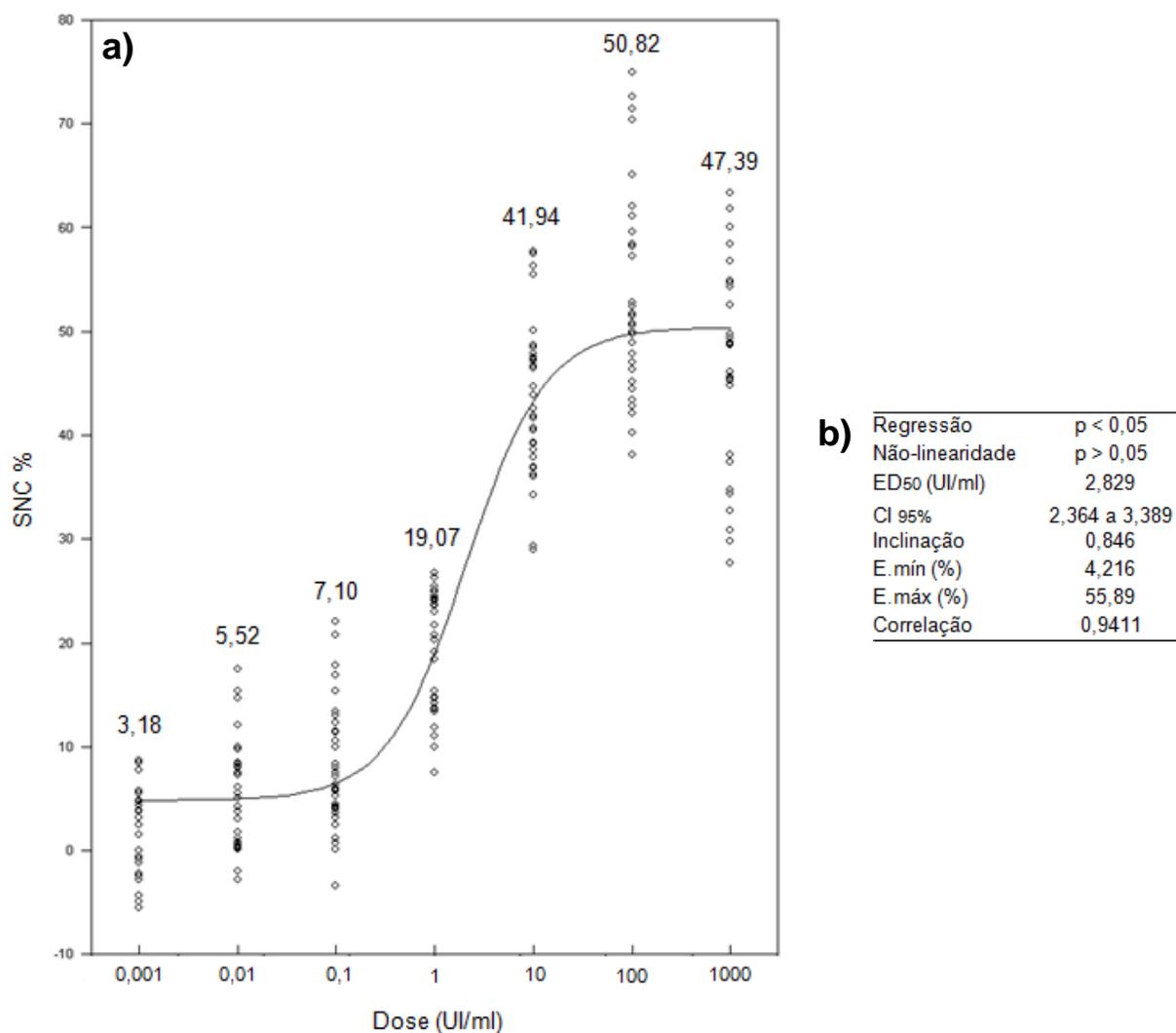


Figura 10. Dados dos ensaios antivirais, utilizando o padrão internacional de IFN alfa-2b, após aplicação do modelo logístico de quatro parâmetros. Em **a)** é exibida a relação entre a dose e a sobrevivência normalizada de células (SNC). Cada ponto representa a média de três determinações distribuídas em 32 ensaios em nove dias diferentes. A mediana de SNC é exibida para cada conjunto de concentração. Em **b)** são exibidos os parâmetros calculados após aplicação do modelo matemático com a remoção dos dados referentes a concentração de IFN a 1000 UI/ml.

4.5.2 Análise de interferência no ensaio antiviral

Um experimento foi desenhado para avaliar distúrbios na viabilidade de células Hep-2C, causado pelo IFN alfa-2b, nas condições do ensaio antiviral. Os resultados dos ensaios para análise de interferência no teste antiviral são exibidos na Figura 4.8. O controle de célula e de vírus apresentaram DO média de $1,054 \pm 0,018$ e $0,412 \pm 0,015$, respectivamente. Os poços contendo células tratadas apenas com IFN alfa-2b nas concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 UI/ml, apresentaram DO média de $1,052 \pm 0,050$; $1,062 \pm 0,019$; $1,034 \pm 0,027$; $1,044 \pm 0,021$; $0,996 \pm 0,011$ e $0,882 \pm 0,027$, respectivamente. Para os poços contendo células tratadas com IFN alfa-2b e desafiadas com o vírus Mengo, as médias das DOs foram de $0,459 \pm 0,008$; $0,522 \pm 0,036$; $0,578 \pm 0,015$; $0,675 \pm 0,032$; $0,821 \pm 0,025$ e $0,774 \pm 0,076$, respectivamente, para as concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 do IFN alfa 2b. O branco de análise contendo somente PBS e solução ácida de isopropanol promoveu DO média de $0,038 \pm 0,001$. A DO média observada nos poços tratados com IFN 1000 UI/ml e não desafiados com o vírus Mengo foi 16,32% menor quando comparado com o controle de célula onde não houve tratamento com IFN alfa-2b. Esta diferença foi significativa quando aplicado o teste *t de Student* não-pareado (índice de confiança de 95%).

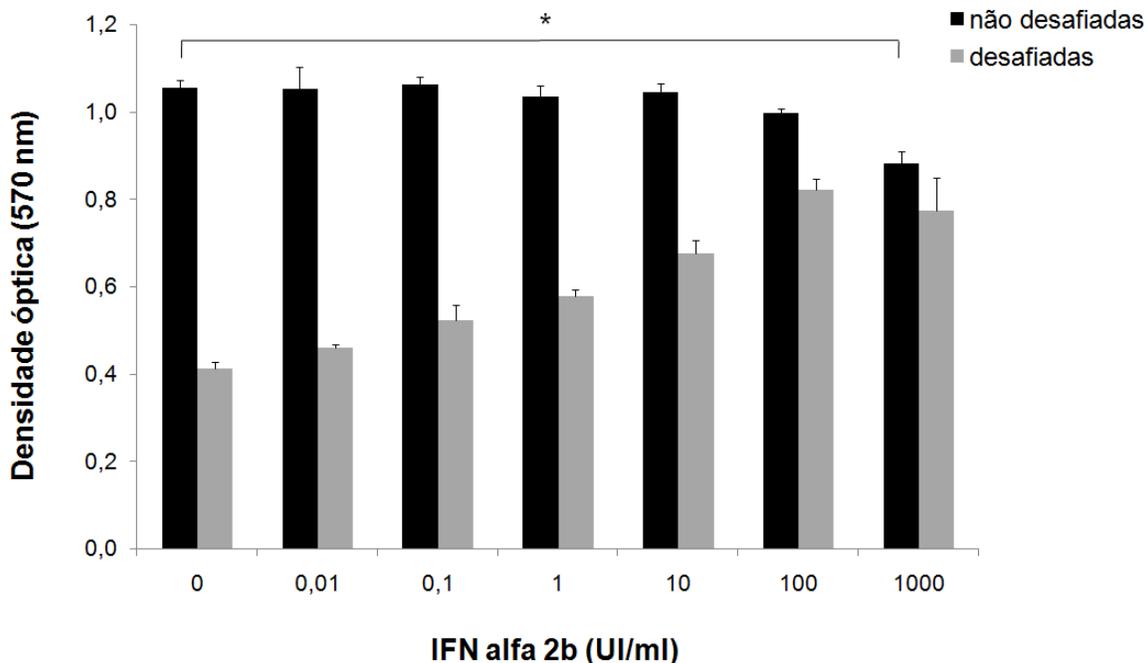


Figura 11. Análise de interferência no teste antiviral. Dados provenientes de três experimentos independentes expressos em média e desvio padrão. A figura mostra a densidade óptica a 570 nm frente aos diversos tratamentos com IFN alfa-2b em células Hep-2C desafiadas ou não com vírus Mengo. * $p < 0,05$ demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste *t* de *Student* não-pareado com índice de confiança de 95%.

4.5.3 Determinação da potência relativa de IFN alfa-2b pelo método da redução do efeito citopático viral

Como aplicação do ensaio antiviral padronizado em células Hep-2C utilizando vírus Mengo, a potência relativa de uma amostra comercial (Produtor 1) foi avaliada contra o padrão internacional de IFN alfa-2b. Sete diluições da preparação biológica foram testadas em triplicata utilizando o modelo logístico de quatro parâmetros no programa Combistats® v4.0. Os parâmetros de regressão, linearidade e paralelismo tiveram relevância estatística (índice de confiança de 95%) quando os dados de SNC% relativos a 1000 UI/ml dos IFNs testados foram removidos dos cálculos. O valor médio de ED_{50} para a preparação de referência foi $2,78 \pm 0,11$ UI/ml e o efeito máximo relativo a SNC (E. máx.) teve uma média de $51,7 \pm 2,1\%$. A estimativa da potência do IFN alfa-2b do Produtor 1 foi em

média $96,2 \pm 14,5$ % do declarado. A suspensão viral utilizada foi titulada em paralelo a cada ensaio sendo observado um título médio de $4,72 \pm 0,35$ logCCID₅₀/ml (Tabela 4.4). Estes dados evidenciam que a preparação comercial de IFN alfa-2b testada cumpriu com a sua especificação de potência mediante o ensaio antiviral empregado.

Tabela 4. Determinação da potência relativa de IFN alfa-2b pelo método da redução do efeito citopático viral.

Ensaio	Referência IFN alfa-2b			E.máx (%)	Correlação	Título do vírus			Produtor 1 est. declarado (%)
	LI	ED ₅₀ (UI/ml)	LS			LI	logCCID ₅₀ /ml	LS	
1	2,31	2,87	3,58	50,1	0,9924	4,04	4,34	4,64	109,7
2	1,83	2,65	3,92	54,1	0,9774	4,45	4,83	5,21	80,9
3	1,70	2,82	4,75	50,9	0,8906	4,60	5,00	5,40	98,1
média ± dp	2,78 ± 0,11		51,7 ± 2,10		4,72 ± 0,35			96,2 ± 14,5	
CV(%)	4,05		4,06		7,31			15,06	

Dados referentes a três ensaios independentes exibindo parâmetros de determinação da potência relativa pelo ensaio de redução do efeito citopático. Os valores de ED₅₀ e logCCID₅₀ são acompanhados dos limites inferior (LI) e superior (LS) do intervalo de confiança de 95 %. A tabela mostra o percentual máximo de sobrevivência normalizada de células durante os testes (E.máx), o coeficiente de correlação em cada ensaio, a estimativa percentual da potência declarada pelo produtor quando comparada com a preparação de referência (est.declarado), a média acompanhada pelo respectivo desvio padrão (dp) e o coeficiente de variação (CV).

4.6 Marcação intracelular de pSTAT1

Com o objetivo de determinar o melhor tempo para estimulação com IFN alfa-2b para a marcação intracelular de pSTAT1, um estudo de cinética foi realizado. Considerando apenas os eventos compreendidos em R3, um total de 20000 eventos foram lidos para cada amostra tratada com 500 UI de IFN alfa-2b por 0, 20, 40, 60 e 80 minutos, os quais tiveram percentuais relativos de marcação de pSTAT1 de 0,81; 20,07; 28,78; 23,67 e 16,65%, respectivamente (Figura 4.9). Estes dados definiram que a etapa de estimulação com IFN alfa-2b durante os experimentos de marcação intracelular de pSTAT1 seria feita com tempo de 40 minutos.

No estudo para determinar a relação entre a dose de IFN alfa-2b e a quantidade de pSTAT1 observada foi determinado que para doses de 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 UI/ml foram observados percentuais de 1,14; 2,12; 3,31; 5,35; 13,62; 25,94 e 39,62% de pSTAT1, respectivamente. Os valores percentuais são referentes a 20000 eventos lidos para cada tratamento. A relação entre a dose de IFN alfa-2b e a quantidade de pSTAT1 observada após a estimulação, mostrou-se dose-dependente em células Hep-2C (Figura 4.10).

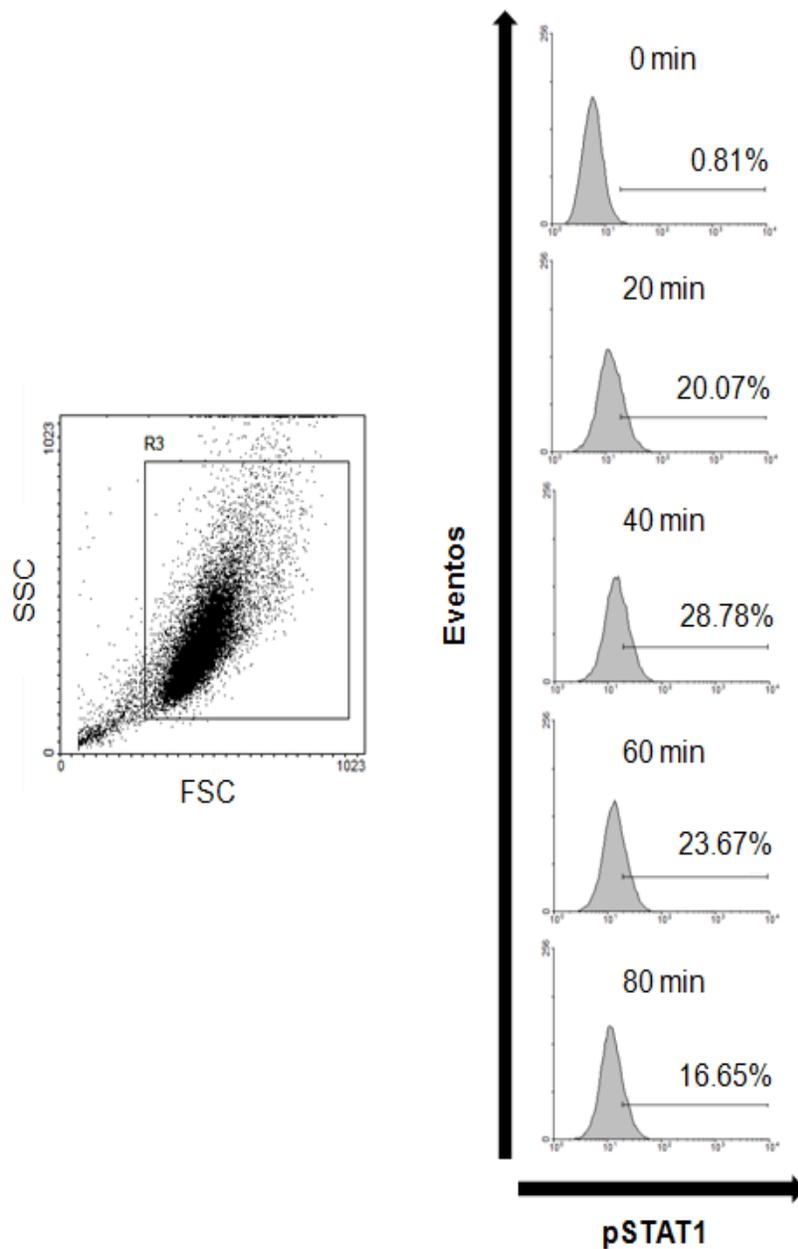


Figura 12. Estudo de cinética da marcação intracelular de pSTAT1 em células Hep-2C. Células foram estimuladas ou não com IFN alfa-2b na concentração de 500 UI/ml sob variação de tempo de 20, 40, 60 e 80 min, adotando, posteriormente, o protocolo de marcação intracelular de pSTAT1. Foram considerados apenas os eventos compreendidos em R3 no gráfico de dispersão de pontos SSC (complexidade) X FSC (tamanho).

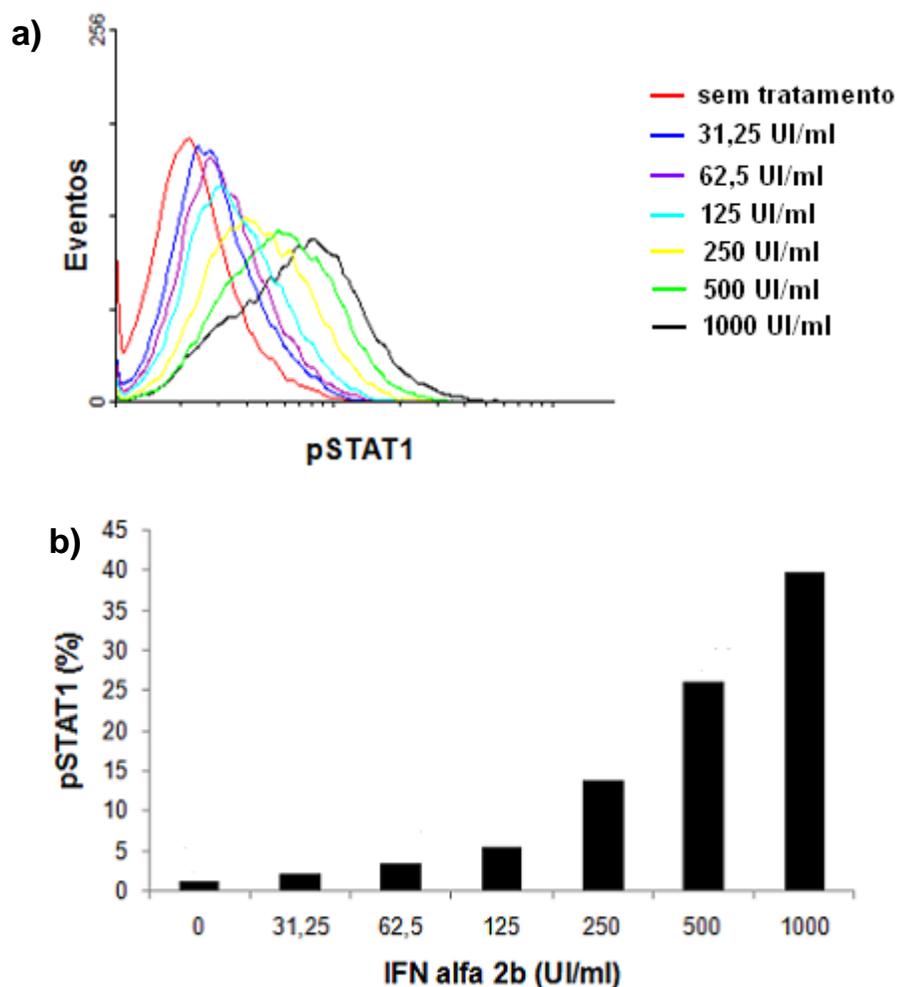


Figura 13. Relação entre a dose de IFN alfa-2b e a quantidade de pSTAT1 observada em células Hep-2C. Células foram estimuladas ou não com IFN alfa-2b por 40 min à concentrações de 1000 a 31,25 UI/ml espaçadas serialmente sob fator 2 0, adotando, posteriormente, o protocolo de marcação intracelular de pSTAT1. São ilustrados a sobreposição de histogramas originais de FACS **(a)** e o percentual de pSTAT1 observado relativo a cada dose de IFN alfa-2b **(b)**.

4.6.1 Determinação da potência relativa do IFN alfa-2b mediante marcação intracelular de pSTAT1

A representação gráfica da estimativa da potência das preparações de IFN alfa-2b testadas mediante determinação de pSTAT1, é exibida na Figura 4.11. O coeficiente de correlação comum às três curvas foi igual a 0,9962, a inclinação comum foi igual a 1,036 e o efeito máximo (assíntota superior) na determinação de

pSTAT1 foi de 38,6%. Os parâmetros de regressão, linearidade e paralelismo foram satisfatórios considerando limite de confiança de 95%. A estimativa da potência do IFN alfa-2b do Produtor 1 foi de 104,2% do declarado com limites de confiança inferior e superior igual a 84,2 e 118,6%, respectivamente. Para o Produtor 2, foi observada potência de 97,1% do declarado com limites de confiança inferior e superior igual a 85,5 e 117,0%, respectivamente. A dose observada de IFN alfa-2b que causou 50% do efeito máximo na ativação de STAT1 (ED_{pstat150}) foi de 203,6; 195,4 e 209,7 UI/ml para a preparação de referência, Produtores 1 e 2, respectivamente. Os limites de confiança de 95% para os valores de ED_{pstat150} não foram menores que 87,7% ou maiores que 113,9% do estimado para todas as preparações testadas.

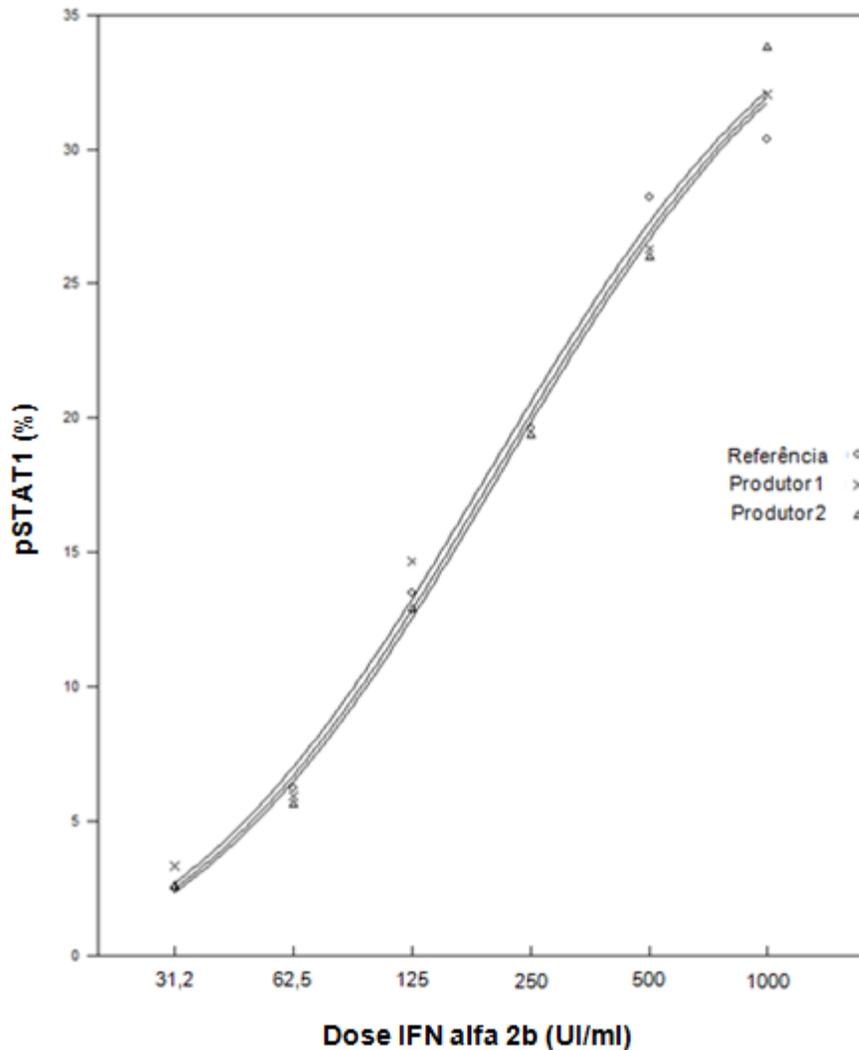


Figura 14. Estimativa da potência de duas preparações de IFN alfa-2b mediante marcação com anticorpo monoclonal anti-pSTAT1 por método de citometria de fluxo. Dois IFNs alfa 2b comerciais (Produtor 1 e 2) foram testados frente à Referência internacional do IFN alfa-2b. O protocolo de marcação intracelular de pSTAT1 foi utilizado fixando a etapa de estimulação em 40 min com doses de 1000 a 31,25 UI/ml espaçadas serialmente sob fator 2 0. Dados foram submetidos ao modelo logístico de quatro parâmetros com o auxílio do programa Combistats® e *plotados* em dose de IFN alfa-2b (UI/ml) por pSTAT1 (%).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A proposta inicial deste trabalho foi padronizar um bioensaio de redução do efeito citopático viral, utilizando células Hep-2C e o vírus Mengo, para ser utilizado no controle da qualidade do IFN alfa-2b mediante a determinação da potência relativa deste biofármaco. Os compêndios nacionais ainda não apresentam monografias para esta finalidade e a Farmacopéia Européia sugere um ensaio de redução do efeito citopático viral, porém deixando em aberto a combinação célula/vírus a ser utilizada, desde que sejam observados parâmetros de validade estatística do ensaio como: linearidade, paralelismo e regressão para um modelo analítico matemático de escolha (COUNCIL OF EUROPE, 2008-a).

No entanto, o ensaio de redução do efeito citopático viral é relativamente longo e uma série de fatores pode interferir no teste como um todo. Tais fatores vão desde a escolha da célula para a realização do teste *in vitro*, a maneira como é feito o estímulo das células com o IFN, a MOI do vírus utilizada, até o método de coloração empregado, entre outros. Ainda, como apontado em 2009 por Dellgren e colaboradores, o efeito antiproliferativo dos IFNs também pode causar interferência neste ensaio de potência, sendo importante a determinação da sua magnitude na linhagem de escolha.

A maneira como as células respondem aos IFNs é variável entre as diferentes linhagens e parece depender do padrão protéico de expressão para cada tipo celular. Células que não expressam ou expressam menos proteínas relacionadas com a atividade que os IFNs exercem (receptores, proteínas intracelulares da via de sinalização pela qual o IFN promove seus efeitos biológicos, etc.) são menos sensíveis aos IFNs, como observado em linhagens que possuem carência de STAT1, STAT2 e IRF9 (GRAHAM et al., 1977; PELLEGRINI et al., 1989; WONG et al., 1997; STOJDL et al., 2000). Em nossos ensaios, utilizamos a linhagem de células Hep-2C para o desenvolvimento dos testes, pois estas já haviam sido sugeridas pela farmacopéia européia em um ensaio modelo para potência de IFNs e, também, a sensibilidade destas aos IFNs já havia sido descrita em 2005 por Meager e

colaboradores (MEAGER, 2005).

Como o método colorimétrico empregado no ensaio de redução do efeito citopático viral é considerado uma etapa crítica, dois procedimentos colorimétricos (cristal violeta e MTT) foram eleitos para determinação da viabilidade celular. Fizemos uma comparação prévia e sistemática entre os dois procedimentos, pois também seria posteriormente utilizado no estudo do efeito antiproliferativo do IFN alfa-2b em células Hep-2C.

Observamos um comportamento não-linear na densidade óptica em altas concentrações celulares (Tabela 4.1) quando células Hep-2C foram coradas com cristal violeta, o qual não foi observado no procedimento utilizando MTT. Provavelmente este fato pode ter ocorrido devido ao arraste mecânico de células na etapa de lavagem das placas em água corrente, como também colocado por Meager, (2002). Embora os coeficientes de variação intra-ensaio para o procedimento com MTT tenham sido ligeiramente superiores em comparação com os observados para o procedimento usando cristal violeta, o coeficiente de variação inter-ensaio foi semelhante em ambos os métodos. No entanto, durante análise feita após a linearização dos dados, foi observado que o método com MTT é mais linear (resposta mais adequada entre as variações de quantidade de célula e leitura do corante) quando comparado com o cristal violeta, o que nos levou a adoção do procedimento colorimétrico com MTT para os ensaios posteriores.

O efeito antiproliferativo que o IFN exerce já foi descrito anteriormente em diversas linhagens celulares como em 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). Ao avaliar o impacto deste efeito causado pelo IFN alfa-2b em células Hep-2C, foi observado que em concentrações próximas a 1000 UI/ml existe uma ação importante de queda na viabilidade celular sugerindo que estas células são consideravelmente sensíveis ao efeito antiproliferativo do IFN alfa-2b. No

entanto, experimentos adicionais para avaliar o efeito apoptótico causado pelo IFN alfa-2b em células Hep-2C seriam necessários para a melhor compreensão desta questão.

Em busca de uma segunda evidência confirmatória do efeito de queda na viabilidade das células Hep-2C causada pelo IFN alfa-2b, estudamos o impacto deste biofármaco no ciclo celular. O efeito inibitório na fase S do ciclo celular causado por IFN tipo I, já havia sido relatado em 1996 por Garrison e colaboradores em um estudo com diversas linhagens de células de glioma. Mais recentemente, em um estudo feito em células de adenocarcinoma humano (H295 e SW13) foi revelado que o IFN alfa-2b nas concentrações entre 500 UI/ml e 1000 UI/ml causa aumento do percentual de células em fase S + G2 do ciclo celular, o que corrobora com a atividade antiproliferativa do IFN alfa-2b nestas células (VAN KOETSVELD et al. 2006). Utilizando a colchicina, que é um inibidor clássico do ciclo celular, utilizado também por Andrew e colaboradores em 1999 como controle positivo, um efeito semelhante também foi observado quando estimulamos células Hep-2C com IFN alfa-2b a 1000UI/ml. O percentual de células em fase S + G2 do ciclo celular aumentou significativamente em relação ao controle onde as células não foram estimuladas com IFN alfa-2b, confirmando o efeito inibitório deste biofármaco na distribuição do ciclo celular desta linhagem.

Com relação ao ensaio in vitro de redução do efeito citopático viral, a etapa na qual ocorre a estimulação com o IFN parece ser bastante peculiar de acordo com a linhagem celular utilizada e existem basicamente duas abordagens de exposição de células ao IFN na literatura para a realização deste ensaio. Em um estudo comparativo da atividade biológica entre IFNs tipo I e tipo III, em 2005, Meager e colaboradores executaram estes ensaios expondo várias linhagens de células aos IFNs após a multiplicação e confluência das mesmas (MEAGER, 2005). Entretanto, existe a descrição deste procedimento, onde células são semeadas já na presença do IFN, o que propicia a vantagem da redução de um dia no tempo total do ensaio (COUNCIL OF EUROPE, 2008-b; DELLGREN et al., 2009). Como no presente trabalho foi observado que na linhagem de células Hep-2C existe efeito antiproliferativo

importante causado pelo IFN alfa-2b, foi decidido realizar a etapa de estimulação com IFN após o alcance da confluência celular nas placas, minimizando assim a heterogeneidade na confluência das células ao longo das diluições de IFN, o que provavelmente prejudicaria a análise dos resultados.

Ao semear as células em placas de 96 poços de fundo chato, constatamos que existe uma melhor homogeneidade da confluência celular após o período de incubação, quando apenas utilizamos os 60 poços centrais das placas. Como exposto por Meager (2002), os poços periféricos de uma placa de 96 poços tendem a gerar um maior número de resultados aberrantes, provavelmente devido à maior velocidade com que a temperatura e o pH variam nestes locais. Embora o uso de uma menor quantidade de poços possa restringir o ensaio a uma menor quantidade de preparações biológicas, Meager (2002) cita que diversos pesquisadores optam por desenhar o ensaio desta forma. Porém, devemos ter em mente que estes “efeitos de placa” ainda podem continuar em menor grau, mesmo nos 60 poços internos.

O vírus empregado no ensaio de redução do efeito citopático viral deve ser capaz de produzir efeito lítico nas células desafiadas. Vírus como o da estomatite vesicular (VSV), encefalomiocardite murina (EMCV), vírus Mengo, dentre outros, são utilizados em certas combinações com células na realização destes ensaios (MEAGER, 2006). A multiplicidade da infecção do vírus empregado é uma variável importante neste ensaio, pois influencia diretamente a viabilidade das células e conseqüentemente nas determinações de ED₅₀ (DELLGREN et al., 2009). Como recomendado em 2009 por Dellgren e colaboradores, a seleção da multiplicidade da infecção viral para o ensaio de redução do efeito citopático foi feita com base no menor título de vírus que resultou na lise celular completa de células Hep-2C não tratadas pelo IFN alfa-2b.

A Farmacopéia Européia define uma série de critérios que devem ser observados para que o ensaio de redução do efeito citopático seja considerado válido. Devem ser observados parâmetros como regressão e linearidade e análise de variância para um dado modelo matemático analítico (no caso, o

modelo logístico de quatro parâmetros). Ao comparar uma preparação biológica teste com uma preparação referência, deve-se observar também o paralelismo entre as curvas e a partir daí proceder com a determinação da potência relativa. De acordo com a monografia da Farmacopéia Européia, uma amostra é considerada aprovada quando a potência relativa estimada é compreendida entre 85 e 125% do declarado pelo fabricante, quando também são observados limites de confiança de 95% não inferiores a 65% e não superiores a 156%, para a estimativa da potência relativa (COUNCIL OF EUROPE, 2008-c). Durante a padronização do ensaio de redução do efeito citopático utilizando o vírus Mengo e células Hep-2C, todos os critérios necessários para aprovação do teste foram observados, porém, quando o teste foi empregado para a determinação da potência relativa de uma preparação comercial, os limites do intervalo de confiança de 95% da estimativa da potência relativa se encontraram fora do especificado pela farmacopéia européia, o que sugere que o teste seja reproduzido com um maior número de replicatas para cada concentração de IFN alfa-2b.

Uma consideração importante foi que ao aplicar o modelo logístico de quatro parâmetros durante a padronização do ensaio e a determinação da potência relativa da amostra comercial, foi necessária a exclusão dos valores de sobrevivência normalizada de células relativos à concentração de 1000 UI/ml de IFN alfa-2b para que se obtivesse validação estatística satisfatória para regressão e linearidade dos dados. Sistemáticamente, fizemos experimentos para avaliar o impacto que o IFN alfa-2b promove na viabilidade celular, nas condições deste ensaio reproduzido com células Hep-2C, e observamos que mesmo após a confluência das células também existe redução significativa da viabilidade celular após tratamento com IFN alfa-2b a 1000 UI/ml por 24 horas (Figura 4.8). Este fato, possivelmente, acaba prejudicando o arranjo ideal dos dados no modelo matemático, como também foi observado por em 2009 por Dellgren e colaboradores ao realizar um estudo de comparação de potência de IFNs mediante ensaio de redução do efeito citopático viral utilizando células Hep-G2 (linhagem humana de hepatócitos) e vírus EMVC.

Outra abordagem para a determinação da atividade biológica dos IFNs é a avaliação de elementos presentes na via de transdução de sinal intracelular ativada por estas citocinas. O primeiro tipo de ensaio que poderia ser aplicado à via de sinalização induzida pelos IFNs é o ensaio de ativação de quinases, que foi descrito em 1999 por Sadick e colaboradores. Neste ensaio, são quantificadas proteínas quinases específicas localizadas em domínios internos do receptor de IFN. No entanto, a quantidade de receptores de IFN tipo I por célula é frequentemente pequena o que poderia levar à dificuldades na obtenção de curvas dose-respostas. Um segundo tipo de ensaio seria a detecção de proteínas STATs que translocassem ao núcleo após o estímulo com IFNs. As proteínas STATs podem ser marcadas com anticorpo específico conjugado com fluorescência e a translocação pode ser quantificada mediante um algoritmo de migração citoplasma-núcleo com o auxílio de um scanner de varredura de fluorescência (Array Scan II Technology - Cellomics), porém o aparelho envolvido é sofisticado e demasiadamente caro (MEAGER, 2006).

O desenvolvimento de anticorpos que reconhecem especificamente proteínas fosforiladas bem como o desenvolvimento de técnicas de marcação intracelular destas proteínas para aplicação em citometria de fluxo (FLEISHER et al., 1999; ILANGUMARAN et al., 2003; KRUTZIK & NOLAN, 2003) possibilitou a detecção da sinalização de citocinas ao nível celular. Conforme descrito em 2004 por Lesinski e colaboradores, a citometria de fluxo já pode ser aplicada para monitorar a ativação de STAT1 em células sanguíneas de pacientes que se submetem à terapia com IFN alfa. Mais recentemente este monitoramento também pode ser efetuado por imunohistoquímica no próprio tecido hepático de pacientes portadores de hepatite C crônica e em terapia com IFNs (MIYAAKI, 2008).

No presente trabalho, decidimos avaliar a possibilidade de desenvolver um bioensaio para determinação da potência do IFN alfa-2b, onde o pSTAT1 seria o desfecho principal. Observamos que a ativação de STAT1 estimulada por IFN alfa-2b e detectada mediante citometria de fluxo, é dose-dependente em células Hep-2C no intervalo de concentração da citocina estudado (31,25 a 1000 UI/ml). A dose-dependência de STAT1 fosforilado com estímulo por IFN

alfa já havia sido observada também em linfócitos por Tochizawa et al. (2006) em um estudo in vivo.

A observação de um evento dose-dependente que pode ser mensurado é a base para o desenvolvimento de um ensaio biológico para 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 que o método de citometria de fluxo utilizando anticorpo monoclonal anti-pSTAT1 é bastante promissor no desenvolvimento de novos ensaios para a determinação da atividade biológica deste biofármaco.

CONCLUSÕES & PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÕES & PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

O ensaio de redução do efeito citopático viral reproduzido com a combinação vírus Mengo / linhagem Hep-2C é bastante informativo na aplicação do controle da qualidade para IFN alfa-2b. Entretanto, por se tratar de um ensaio com várias etapas, é passível de apresentar grande heterogeneidade nos resultados o que pode gerar dados inconclusivos.

Para determinar a viabilidade de células Hep-2C, o método de coloração utilizando MTT é mais linear quando comparado com o método utilizando cristal violeta, sendo, então, o primeiro mais indicado para o ensaio de redução do efeito citopático. Vimos também que linhagens de células Hep-2C são sensíveis ao efeito antiproliferativo causado pelo IFN alfa-2b, também confirmado pelo arraste significativo na fase S + G2 do ciclo celular que esta citocina promove nestas células, podendo, também, este fato causar interferência no ensaio de redução do efeito citopático

Para minimizar a falta de ajuste ao modelo matemático (modelo logístico de quatro parâmetros) empregado para a determinação da potência relativa em ensaios de redução do efeito citopático utilizando células Hep-2C e vírus Mengo, com os resultados obtidos neste estudo, é recomendado que o ensaio deva ser realizado em um número de replicatas maior do que três para cada concentração de IFN. Quando realizado em placa de 96 poços, sugerimos que apenas os 60 poços internos das placas devam ser utilizados e que a etapa de estimulação com o biofármaco deva ser feita uma vez que a multiplicação e a confluência celular forem observadas. Outra recomendação importante é que concentrações próximas a 1000 UI/ml de IFN alfa-2b não devem ser consideradas durante a estimativa da potência das preparações.

Concluimos também, que a ativação de STAT1 é dose-dependente em células Hep-2C quando estimuladas com IFN alfa-2b no intervalo de concentração de 31,25 a 1000 UI/ml, e que este fato pode vir a ser especulado no desenvolvimento de um novo ensaio para a determinação da atividade

biológica de IFNs, utilizando método de citometria de fluxo com aplicabilidade direta no controle da qualidade destes biofármacos.

6.2 Perspectivas

Como perspectiva, o método de citometria de fluxo em conjunto com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais fosfo-específicos, sem dúvida podem levar a ampliação dos ensaios de atividade biológica para proteínas terapêuticas recombinantes como os IFNs. O teste de potência para IFNs baseado na ativação de intermediários fosforilados já foi apontado em 2006 por Meager como bastante promissor, uma vez que apresenta inúmeras vantagens como menor tempo de ensaio, a independência de manipulação viral, menor uso de equipamento, dentre outras. No entanto, ensaios adicionais, como um número maior de experimentos em citometria de fluxo e ensaios de *western blot*, ainda são necessários para gerar garantia estatística e comprovar a especificidade da ligação ao STAT1, respectivamente.

A continuidade deste trabalho no sentido de desenvolver um novo ensaio biológico para determinar a potência relativa de IFNs baseado na formação de intermediários fosforilados intracelulares, é intenção dos envolvidos nesta dissertação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ANDREW, C.; BOQUEST, B. N. AND RANDALL S. P. Flow Cytometric Cell Cycle Analysis of Cultured Porcine Fetal Fibroblast Cells. **Biology of Reproduction**. v. 60, p. 1013–1019. 1999.
- ANK, N. W. H.; PALUDAN, S. R. IFN-I: novel antiviral cytokines. **J Interferon Cytokine Res**. v. 26, p. 373–379. 2006.
- BARBER, G. N.; JAGUS, R.; MEURS, E. F.; HOVANESSIAN, A. G.; KATZE, M. G. Molecular mechanisms responsible for malignant transformation by regulatory and catalytic domain variants of the interferon-induced enzyme RNA-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem**. v. 270, p. 17423-17428. 1995.
- BILLIAU, A. Interferon-gama: biology and role in pathogenesis. **Adv. Immunol**. v. 62, p. 61-130. 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**. v. 42, p. 4948–4953. 1982.
- BOUILLON, M. AND AUDETTE, M. Transduction of retinoic acid and g-interferon signal for intercellular adhesion molecule-1 expression on human tumour cell lines: evidence for the late-acting involvement of protein kinase C inactivation. **Cancer Res**. v.53, p. 826-832. 1993.
- CLARK, V. AND NELSON, D. R. Novel Interferons for treatment of Hepatitis C. **Virus Clin Liver Dis**. v.13, p. 351-363. 2009.
- CONTENTE S, KENYON K, RIMOLDI D, FRIEDMAN RM. Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras. **Science**. v. 249, p. 796-798. 1990.
- CORADINI, D.; BIFFI, A.; PIRRONELLO, E.; DI FRONZO, G. The effect of alpha-, beta- and gamma-interferon on the growth of breast cancer cell lines. **Anticancer Res**. v.14, p. 1779-1784. 1994.
- COUNCIL OF EUROPE. Statistical Analysis of results of biological assays and tests, Chp. 5. in: The European Pharmacopoeia 6th ed., Strasbourg, France. p. 571-600. 2008-a
- COUNCIL OF EUROPE. Assay of Interferons. In: The European Pharmacopoeia 6th ed., Strasbourg, France. p. 627-629. 2008-b.
- COUNCIL OF EUROPE. Interferon alpha 2 concentrated solutions. In: The European Pharmacopoeia 6th ed., Strasbourg, France. p. 2150-2153. 2008-c.
- DAMDINSUREN, B.; NAGANO, H.; SAKON, M.; KONDO, M.; YAMAMOTO, T.; UMESHITA, K.; DONO, K.; NAKAMORI, S.; MONDEN, 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** v. 10, p. 1184-1190. 2003.
- DE CLERCQ, E. Interferon and its inducers – a never-ending story: “old” and “new” data in a new perspective. **J Infect Dis**. v.194, p. S19-S26. 2006.
- DE LA MAZA, L. AND PETERSON, E. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant gamma IFN on the concentration of tryptophan in culture medium. **Cancer Res**. v. 48, p. 346-350. 1988.
- 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**. v. 270, p. 23860-23866. 1995.
- DELLGREN, C.; GAD, H. H.; HAMMING, O. J.; MELCHJORSEN, J. AND HARTMANN, R. Human interferon- λ 3 is a potent member of the type III interferon family. **Genes and Immunity**. v.10, p. 125-131. 2009.
- DE MAEYER, E.; DE MAEYER-GUIGNARD, J. **Interferons and Other Regulatory Cytokines**. New York: Wiley Interscience, 1988.
- DICK, R. S. AND HUBBELL, H. R. Sensitivities of human glioma cell lines to interferons and double-stranded RNAs individually and in synergistic combinations. **J Neurooncol**. v.5, p. 331-338. 1987.
- EDQM - CombiStats v 4.0 – Council of Europe, www.combistats.eu. 2008.
- FARDELONE, L. C. AND BRANCI, B. A. O setor de biofármacos e as oportunidades para o Brasil. **Rev FAE**. v. 9(2), p. 29-38. 2006.
- FELLOUS, M.; KAMOUN, M.; GRESSER, I.; BONO, R. Enhanced expression of HLA antigens and β 2-microglobulin on interferon-treated human lymphoid cells. **Eur J Immunol**. v. 9(6), p. 446-449. 1979.
- FLEISHER, T. A.; DORMAN, S. E.; ANDERSON, J. A.; VAIL, M.; BROWN, M. R.; HOLLAND, S. M. Detection of intracellular phosphorylated STAT-1 by flow cytometry. **Clin. Immunol**. v. 90(3), p. 425-430. 1999.
- FORNS, X. AND BUKH, J. The Molecular Biology of Hepatitis C Virus: Genotypes and Quasispecies. **Clinics in Liver Disease**. v. 3(4), p. 693-716. 1999.
- GARRISON, J. I.; BERENS, M. E.; SHAPIRO, J. R.; TREASURYWALA, S.; FLOYD-SMITH, G. Interferon-beta inhibits proliferation and progression through S phase of the cell cycle in five glioma cell lines. **J Neurooncol**. v. 30, p. 213-223. 1996.
- GIBSON, U. E. M. AND KRAMER, S. M. Enzyme-linked bio-immunoassay for IFN-gama by HLA-DR induction. **J Immunol Methods**. v. 125(1-2), p. 105-113. 1989.
- GRAHAM, F.; SMILEY, J.; RUSSELL, W. C.; NAIRN, R. Characteristic of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **J Gen**

Viol. v. 36(1), p. 59–74. 1977.

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.

GRUBBS, F. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples, **Technometrics**. v. 11(1), p. 1-21. 1969.

HERMODSSON, S.; STRANNEGARD, O.; JEANSSON, S. Bioimmunoassays (BIAs) of human interferon. **Proc Soc Exp Med**. v. 175, p. 44-51. 1984.

HERON, I.; HOKLAND, M.; BERG, K. Enhanced expression of $\beta 2$ - microglobulin and HLA antigens on lymphoid cells by type I interferons. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.** v. 75, p. 6215-6219. 1978.

HILFENHAUS, J.; DAMM, H.; KARGES, H. E.; MANTHEY, K. F. Growth inhibition of human lymphoblastoid Daudi cells in vitro by interferon preparations. **Arch Virol**. v. 51(1-2), p. 87-97. 1976.

HOKLAND, M. AND BERG, K. Interferon enhances the antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of human polymorphonuclear leukocytes. **J Immunol** v. 127, p. 1585-1588. 1981.

ILANGUMARAN, S.; FINAN, D.; ROTTAPPEL, R. Flow cytometric analysis of cytokine receptor signal transduction. **J Immunol Methods**. v. 278, p. 221-234. 2003.

ISAACS, A. & LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**. v. 147, p. 258-267. 1957.

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.

JULKUNEN, I.; LINNAVUORI, K.; HOVI, T. Sensitive interferon assay based on immunoenzymatic quantification of viral antigen synthesis. **J Virol Methods**. v. 5, p. 85-91. 1982.

KRUTZIK, P. O. AND NOLAN, G. P. Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: Monitoring single cell signaling events. **Citometry**. part A, v. 55A, p. 61-70. 2003.

KUMAR, R.; CHOUBEY, D.; LENGYEL, P.; SEN, G. C. Studies on the role of the 2V-5V-oligoadenylate synthetase–RNase L pathway in b-interferon-mediated inhibition of encephalomyocarditis virus replication. **J Virol**. v. 62, p. 3175-3181. 1988.

LENGYEL, P. Biochemistry of interferons and their actions. **Annu Rev Biochem**. v. 51, p. 251-282. 1982.

LENGYEL, P. Tumor-suppressor genes: news about the interferon connection.

Proc Natl Acad Sci U. S. A. v. 90, p. 5893-5895. 1993.

LESINSKI, G. B.; KONDADASULA, S. V.; CRESPI, T.; SHEN, L.; KENDRA, K.; WALKER, M.; CARSON III, W. E. Multiparametric flow cytometric analysis of inter-patient variation in STAT1 phosphorylation following interferon alpha immunotherapy. **J Natl Cancer Inst.** v. 96, p. 1331-1342. 2004.

LEVY, S.; 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.** v. 16, p. 89-109. 1998.

LEWIS, J. A. Biological assay of interferons. In: Clemens, M. J.; Morris, A. G.; Gearing, A. J. H. (Eds.), *Lymphokines and Interferons: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p. 73. 1987.

MC CULLOCH, C. E. Generalized linear models. **Journal of the American Statistical Association.** v. 95(452), p. 1320-1324. 2000

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

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

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

MEAGER, A.; VISVALINGAM, K.; DILGER, P.; BRYAN, D.; WADHWA, M. Biological activity of interleukins-28 and -29: Comparison with type I interferons. **Cytokine.** v. 31, p. 109-118. 2005.

MENNECHET, F. J. AND UZÉ, G. Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. **Blood.** v. 107(11), p. 4417-4423. 2006.

MEURS, E. F.; GALABRU, J.; BARBER, G. N.; KATZE, M. G.; HOVANESSIAN, A. G. Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.** v. 90, p. 232-236. 1993.

MIRE-SLUIJ, A. R.; GAINES, D. R.; GERRARD, T.; PADILLA, A.; THORPE, R. Biological assays: their role in the development and quality control of recombinant biological medicinal products. **Biol.** v. 24, p. 351-361. 1996.

- MIYAAKI, H.; ICHIKAWA, T.; NAKAO, K.; TAKESHITA, S.; SHIBATA, H.; OZAWA, E.; AKIYAMA, M.; MIUMA, S.; EGUCHI, K. Predictive value of the phosphorylation of signal transducers and activators of transcription in the outcome of interferon therapy for chronic hepatitis C. **Intervirolgy**. v. 51, p. 394–399. 2008.
- MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica. São Paulo, Brasil. ed Roca. 2007.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63. 1983.
- NOTHENBERG, M. Advento de biogênicos tarda e pode falhar. **Revista Química e Derivados**. São Paulo. n. 477. set. 2008. Disponível em: <<http://www.quimicaederivados.com.br/revista/qd477/biofarma/biofarma.html>>. Disponível em: 1 de abril de 2010.
- OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development. **Segundo encontro OECD sobre estatística em biotecnologia, em maio de 2001**. Disponível em: <<http://stats.oecd.org/glossary/index.htm>>. Disponível em: 31 de março de 2010.
- ONOGUCHI, K.; YONEYAMA, M.; TAKEMURA, A.; AKIRA, S.; TANIGUCHI, T.; NAMIKI, H.; FUGITA, T. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. **J Biol Chem**. v. 282, p. 7576-7581. 2007.
- PELLEGRINI, S.; JOHN, J.; SHEARER, M.; KERR, I.; GEORGE, S. R. Use of a selectable marker regulated by interferon to obtain mutations in the signaling pathway. **Mol Cell Biol**. v. 9, p. 4605-4612. 1989.
- RANDALL, R. AND GOODBOURN, S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. **Journal of General Virology**. v. 89, p. 1-47. 2008.
- 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**. v. 89, p. 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 interferon-treated, encephalomyocarditis virusinfected HeLa cells. **J. Virol**. v.54, p. 894-898. 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.
- SADICK, M. D. Kinase receptor activation (KIRA): a rapid and accurate alternative to end-point bioassays. **Dev Biol Stand**. v. 97, p. 121-133. 1999.

SADLER, A. AND WILLIAMS, B. Interferon-inducible antiviral effectors. **nature reviews immunology**. v. 8, p. 559-658. 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.

SEKAR, V.; ATMAR, V. J.; JOSHI, A. R.; KRIM, M.; KUEHN, G. Inhibition of ornithine decarboxylase in human fibroblast cells by type I and II interferons. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 114, p. 950-954. 1983.

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

STAEHEL, P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. **Adv Virus Res**. v. 38, p. 147-200. 1990.

STARK, G. R.; KERR, I. M.; WILLIAMS, B. R.; SILVERMAN, R. H.; SCHREIBER, R. D. How cells respond to interferons. **Annu Rev Biochem**. v. 67, p. 227-264. 1998.

STOJDL, D. F.; LICHTY, B.; KNOWLES, S.; MARIUS, R.; ATKINS, H.; SONENBERG, N.; BELL, J. C. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously known oncolytic virus. **Nature Med**. v. 6, p. 821-825. 2000.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34(1), p. 69-82. 2001.

TAN, S-L. AND 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**. v. 19, p. 543-554. 1999.

THORPE, R.; WADHWA, M.; MIRE-SLUIJS, A. R. The use of bioassays for the characterization and control of biological therapeutic products produced by biotechnology. **Dev Biol Stand**. v. 99, p. 79-88. 1997.

TOCHIZAWA, S.; OHMOTO, Y.; MORI, T. A novel modification of a flow cytometric assay of phosphorylated STAT1 in whole blood lymphocytes for rapid detection of interferon- α signal in vivo. **Journal of Immunological Methods**. v. 313, p. 29-37. 2006.

UZE, G. AND MONNERON, D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. **Biochimie**. v. 89, p. 729-734. 2007.

VAN KOETSVELD, P. M.; VITALE, G.; DE HERDER, W. W.; FEELDERS, R. A.; VAN DER WANSEM, K.; WAAIJERS, M.; VAN EIJCK, C. H. J.; SPEEL, E. M.; CROZE, E., VAN DER LELY, A.; LAMBERTS, S. W. J.; HOFLAND, L. J. Potent inhibitory effects of type I interferons on human adrenocortical carcinoma cell growth. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 91(11), p. 4537-4543. 2006.

VILLEN, R. A. *Biotechnologia: Histórico e tendências*. Ed. Mandruvá.

<<http://www.hottopos.com/regeq10/rafael.htm>> Disponível em 13 de abril de 2010.

VOGEL, S. N.; FINBLOOM, D. 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.** v. 130, p. 1210-1214. 1983.

VON BUBNOFF, D.; ANDRÈS, E.; HENTGES, F.; BIEBER, T.; MICHEL, T.; ZIMMER, J. Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin. **J Allergy Clin Immunol.** v. 125(1), p. 60-68. 2010.

WADHWA, M.; BIRD, C.; PAGE, L. Quantitative biological assays for individual cytokines. In: Balkwill, F.R. (ed.) Cytokines: a practical approach. Oxford: IRL. p. 357-391. 1995.

WEBER, F. Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system. **World J Gastroenterol.** v. 13(36), p. 4818-4823. 2007.

WONG, L. H.; KRAUER, K. G.; HATZINISIRIOU, I.; ESTCOURT, M. J.; HERSEY, P.; TAM, N. D.; EDMONDSON, S.; DEVENISH, R. J.; RALPH, S. J. Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3 gamma. **J Biol Chem.** v. 272, p. 28779-28784. 1997.

ZHANG, K. AND 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.** v. 200, p. 522-528. 1994.

ZHOU, A.; HASSEL, B. A.; SILVERMAN, R. H. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. **Cell.** v. 72, p. 753-765. 1993.

ZHOU, Z.; HAMMING, O. J.; ANK, N.; PALUDAN, S. R.; NIELSEN, A. L.; HARTMANN, R. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases. **J Virol.** v. 81, p. 7749-7758. 2007.