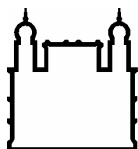


**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**ESTUDO DA INFECÇÃO PELO TMEV EM CULTURAS DE CÉLULAS
BHK-21 PARA AVALIAR A ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO IFN- β
HUMANO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA.**

ÁLVARO JORGE VELLOSO

**RIO DE JANEIRO
2009**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ÁLVARO JORGE VELLOSO

**ESTUDO DA INFECÇÃO PELO TMEV EM CULTURAS DE CÉLULAS
BHK-21 PARA AVALIAR A ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO IFN- β
HUMANO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologias em Imunobiológicos como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2009

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

V441

Velloso, Álvaro Jorge

Estudo da infecção pelo TMEV em culturas de células BHK-21 para avaliar atividade terapêutica do IFN- β humano na esclerose múltipla / Álvaro Jorge Velloso. – Rio de Janeiro, 2009.

xvi, 53 f. : il. ; 30 cm.

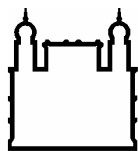
Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 48-52

1. TMEV. 2. Células BHK-21. I. Título.

CDD 572 8

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologias Recombinantes - LATER, sob a orientação da Prof^a Dr^a Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

ÁLVARO JORGE VELLOSO

**ESTUDO DA INFECÇÃO PELO TMEV EM CULTURAS DE CÉLULAS
BHK-21 PARA AVALIAR A ATIVIDADE TERAPÊUTICA DO IFN- β
HUMANO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza

Dissertação aprovada em 22 de junho de 2009

Examinadores:

**Prof^a Dr^a Rita de Cassia Nasser Cubel Garcia
Universidade Federal Fluminense
Presidente**

**Prof^o Dr Ricardo Galler
Bio-Manguinhos/Fiocruz**

**Prof^o Dr Marcelo Alves Pinto
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz**

**RIO DE JANEIRO
2009**

Aos meus pais
Cid Antônio Velloso (*in memorium*) e Wanda da Silva Velloso, pelo amor, dedicação, carinho
e sacrifícios durante a minha educação.

Aos meus avós
Assuero Velloso e Maria Borges Velloso (*in memorium*), pelo incentivo, e conselhos que se
perpetuam e superam as saudades.

A minha filha
Jéssica Guimarães Velloso, pelo companheirismo e por ser tão importante.
na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e presença na minha vida e nos meus passos.

Ao diretor de Bio-Manguinhos Dr^o Akira Homma e ao coordenador do mestrado Dr^o Ricardo Galler, pela oportunidade da realização desta tese de mestrado.

À coordenadora do mestrado Dr^a Sheila Farage pelos conselhos, dedicação e profissionalismo aos alunos do mestrado profissional.

A Profa. Dra. Márcia Terezinha Baroni, pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, paciência e por aceitar o desafio de iluminar esta caminhada.

A Dr^a. Nádia Batoreu pela permissão para fazer parte da equipe do Laboratório de Tecnologia de Recombinantes, no Pavilhão Rocha Lima, durante o trabalho.

A uma grande amiga a Mestra Carina Cantelli Pacheco de Oliveira, pela ajuda e amizade, de tanta valia nos momentos mais difíceis e nos fáceis também.

A Zaíra Antunes e Andréa Ayrosa, pelo apoio, paciência e ajuda, durante o curso do mestrado.

Aos professores, e convidados pelas aulas e seminários que foram apresentadas e ministradas em todas as disciplinas durante o período do mestrado.

A Catia Inês, do INCQS que gentilmente nos cedeu uma das linhagens celulares utilizadas neste trabalho.

Ao Dr^o Pedro Fernando, do IEC que gentilmente nos cedeu à amostra de vírus utilizada neste trabalho.

Ao laboratório de virologia comparada do IOC, em especial a Túlio Machado, pelo apoio.

À Fernanda Rimolli de Castro Araújo pelo apoio.

Aos amigos e amigas pela dedicação, durante passos importantes deste trabalho Eneida Santos de Almeida, Carlos Otávio Alves Viana, Sérgio da Silva Mouta Junior, Haroldo Cid de Silva, Junior, Eliane Barbosa Baroni.

A todos os colegas do mestrado pelo companheirismo pela amizade pelo carinho em todas as horas.

À Equipe do Laboratório de Febre Amarela pela compreensão e colaboração em especial a Ivone Cristina, pelo apoio.

Aos meus irmãos Alexandre Velloso, Ana Cristina Velloso, e Cleide Lucia Velloso Pelo apoio.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O interferon beta	1
1.1.1. Aplicação clínica do IFN- β	2
1.2. A doença Esclerose Múltipla	3
1.2.1. Modelos experimentais <i>in vivo</i> para estudo da esclerose múltipla	5
1.3. O vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV)	7
1.3.1. Classificação - Histórico	7
1.3.2. Estrutura do TMEV	10
1.3.3. Replicação do TMEV	14
1.4. Aspectos de relevância	15
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Adaptação de uma amostra de células infectadas com o vírus BeAn 8386 obtida através da inoculação em cérebro de camundongos em cultura de célula BHK-21	17
3.1.1. Culturas de células BHK-21	17
3.1.2. Adaptação da amostra BeAn8386 à cultura celular BHK-21	17
3.2. Estabelecimento do método de RT-PCR visando à detecção de infecção em culturas celulares BHK-21 inoculadas pelo TMEV	19
3.2.1. Extração de RNA total a partir de monocamadas de células BHK-21 infectadas pelo TMEV e controle celular.	19
3.2.2. Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	19
3.2.3. Análise dos <i>amplicons</i>	21
3.3. Padronização de um método de PCR em tempo real visando quantificar o genoma viral de culturas celulares BHK-21 infectadas pelo TMEV	21
3.3.1. Clonagem das sequências nucleotídicas relativas a IRES, região 3A3B e L*, do TMEV visando a obtenção de uma curva-padrão.	21
3.3.2. Gigapreparações plasmidiais das construções plasmidiais pCRIRES, pCRL* e pCR2.13A3B	22
3.3.3. Sequenciamento nucleotídico das construções plasmidiais pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B	23
3.3.4. Oligonucleotídeos iniciadores de cadeia e sondas utilizadas para a PCR em tempo real	23
3.3.5. Reação de síntese de DNA complementar (cDNA) para utilização como molde na reação de PCR em tempo real	24
3.3.6. Construção das curvas padrões de PCR em tempo real para o TMEV	25
3.3.7. PCR em tempo real utilizando o cDNA obtido a partir do RNA extraído de células BHK-21 infectadas com TMEV	25
3.4. Construção do vetor plasmidial para clonagem do gen L*	26
3.5. Expressão transitória da proteína L* do TMEV em células HEK-293-T	28
3.5.1. Ensaio de transfecção	28
3.5.2. Análise da expressão da proteína L* em células HEK-293-T	28
3.6. Obtenção de soro policlonal anti-L* utilizando a metodologia de imunização genética	29
3.6.1. Procedimento de inoculação	29
3.6.2. Avaliação de soro policlonal por Western-blot	29

4. RESULTADOS	31
4.1. Adaptação de uma amostra do vírus BeAn 8386 obtida através da inoculação em cérebro de camundongos em cultura celular BHK-21	31
4.2. Ensaio de titulação em placas para avaliação do título viral da amostra BeAn8386 adaptada à cultura celular BHK-21	32
4.3. Estabelecimento do método de RT-PCR visando detectar infecção em culturas celulares BHK-21 inoculadas com TMEV	32
4.4. Padronização de um método de PCR em tempo real visando quantificar estoques virais de culturas celulares BHK-21 infectadas pelo TMEV	35
4.5. Clonagem e expressão do gen L* do TMEV em sistema de células de mamífero	39
4.6. Imunização genética visando obtenção de soros policlonais anti-L*	41
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	46
7. PERSPECTIVAS	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa - aminoácidos

anti-IFN- β - anti-interferon beta

BHK-21 - Do termo inglês *Baby Hamster Kidney* (células de rim de *hamster* neonato)

BSA - Do termo inglês *Bovine Serum Albumin* (soroalbumina bovina)

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius ou centígrados

cdNA - Do termo inglês *Complementary DNA* (DNA complementar)

CEUA - Comitê de Ética para Uso de Animais

CHO - Do termo inglês *Chinese Hamster Ovary Cells* (células de ovário de *hamster* chinês)

CPE - Do termo inglês *Citopathic Effect* (efeito citopático)

DA - Do termo inglês *Daniel Strain*

DMEM - Do termo inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (meio de cultura celular Dulbecco's modificado)

DNA - Do termo inglês *Dexoribonucleic Acid* (ácido dexoribonucléico)

EAE - do termo inglês *Experimental Allergic Encephalomyelitis* (or autoimmune)

EBV - vírus Epstein-bar

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

EM - Esclerose Múltipla

EMCV - do termo inglês *Murine Encephalomyocarditis Virus* (vírus da encefalomiocardite murina)

EUA - Estados Unidos da América

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GI - Do termo inglês *Genetic Immunization* (Imunização Genética)

GN - Glomerulonefrite

HBsAg - antígeno de superfície do vírus da hepatite B

HCMV - citomegalovírus humano

HEK-293-T - Do termo inglês *Human Embryonic Kidney 293 Cells* (Linhagem de células renais embrionárias humanas, contendo o antígeno T do vírus símio 40).

HSA - soro albumina humana

HSV - vírus herpes simples

HTVC - Do termo inglês *TMEV-Like Cardiovirus*

- IFNAR** - Do termo inglês *Interferon N* (alpha, beta and omega) Receptor (receptor de interferon N - alfa, beta e gama)
- IFNGR** - Do termo inglês *Interferon Gamma Receptor* (receptor de interferon gama)
- IFNs ($\alpha/\beta/\gamma/\omega$)** - interferons alfa/beta/gama/ômega
- Ig** – Imunoglobulina
- IL** – interleucina
- IMAC** - Do termo inglês *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*
- INCQS** - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- IRF** - Do termo inglês *Interferon Regulatory Factor* (fator regulatório de interferon)
- IRES** - Do inglês *Structure Of Internal Ribosome Entry Site*
- ISGF-3** - Do termo inglês *Interferon-Stimulated Gene Factor 3* (fator estimulador 3 do gene do interferon)
- JAK** - Do termo inglês *Janus Kinase* (janus quinase)
- kDa** - KiloDaltons
- L**- Do termo inglês *Leader protein*
- LAEAN** - Laboratório de Experimentação Animal
- LATAM** - Laboratório de Anticorpos Monoclonais
- LATER** - Laboratório de Tecnologias de Recombinantes
- LB** - Meio de cultivo Luria Bertani
- MBP** - Do termo inglês *Myelin Basic Protein* (proteína básica da mielina)
- MGMT** - Metilguanina-DNA metiltransferase
- MHC** - Do termo inglês *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
- M-MLV**- Do termo inglês *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase*
- MPTI** - Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos
- MOG** - Do termo inglês *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein* (glicoproteína oligodentrócita da mielina)
- MOI** - Do termo inglês *Multiplicity Of Infection* (multiplicidade de infecção)
- MS** – Ministério da Saúde
- NK** - Do termo inglês *Natural Killer* (células matadoras naturais)
- OGMs** - Organismos Geneticamente Modificados
- ORF** – do termo inglês *Open Reading Frame* (seqüência de leitura aberta)
- pb** - pares de bases de nucleotídeos
- PBS** - Do termo inglês *Phosphate Buffered Saline* (tampão salina-fosfato)

PBS-T - Do termo inglês *Phosphate Buffered Saline-Tween* (tampão salina-fosfato /detergente Tween)

pH - concentração de hidrogênio iônico

PLP – do termo inglês *Proteo Lipid Protein* (proteína-proteolipídica da mielina)

PPMS - do inglês *Primary Progressive Multiple Esclerosis*

q.s.p. – quantidade suficiente para

RNA - Do termo inglês *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucléico)

RPMS - Do termo inglês *Relapsing Progressive Multiple Esclerosis*

RRMS - Do termo inglês *Relapsing Remiting Multiple Esclerosis*

RT-PCR - Do termo inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa)

SAFV - Do termo inglês *Saffold vírus*

SAP - Do termo inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase* (fosfatase alcalina de camarão)

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio)

SFB - Soro fetal bovino

SJL - do termo inglês *Swiss James Lambert*

SNC - Sistema Nervoso Central

SPMS - do termo inglês *Secondary Progressive Multiple Esclerosis*

STAT - Do termo inglês *Signal Transducers and Activators of Transcription* (sinais transdutores e ativadores da transcrição)

T_H1 - Linfócitos T *helper* 1 (linfocito T auxiliares)

T_H2 - Linfócitos T *helper* 2 (linfocito T auxiliares)

TMEV – Do termo inglês *Theiler's Murine Encephalomyelitis Vírus* (vírus da encefalomielite murina de Theiler)

TMEV-IDD - Do inglês *Induced Demyelinating Disease Theiler's Murine Encephalomyelitis Vírus* (modelo da doença desmielinizante induzida pelo vírus da encefalomielite murina de Theiler)

TMZ - Temozolomida

TRV - Do termo inglês *TMEV like rat vírus*

UNG – Do termo inglês *Uracil N-glicosilase*

VHEV – Do termo inglês *Vilyuisk human encephalomyelitis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo esquemático da molécula do interferon beta.....	1
Figura 2 – Aspectos da resposta imune, induzida pela infecção do vírus TMEV em camundongos suscetíveis (SJL) e resistentes (B6).....	9
Figura 3 – Modelo esquemático da partícula viral do TMEV.....	11
Figura 4 – Esquema representativo do genoma do TMEV e alguns aspectos da proteína L e L*.....	12
Figura 5 – Esquema representativo mostrando a presença de um AUG alternativo para tradução e síntese da proteína L*.....	13
Figura 6 – Esquema representativo do genoma do TMEV e as regiões que foram amplificadas, utilizando os respectivos oligonucleotídeos iniciadores de cadeia.....	26
Figura 7 – Mapa do vetor plasmidial pcDNA4/HisMAX.....	27
Figura 7A – Fotografia obtida da cultura celular BHK-21 não-infectada após 48hs de incubação, garrafas de 25cm ² (controle celular).....	31
Figura 7B – Fotografia obtida da cultura celular BHK-21 infectada com 100µL de amostra TMEV-BeAn 8386 recebida de Belém, após 48h de incubação.....	32
Figura 8A – Figura do gel de agarose contendo amplicons resultantes da técnica de RT-PCR relativos à infecção de célula BHK-21 por TMEV.....	33
Figura 8B – Figura do gel de agarose contendo amplicons resultantes da técnica de RT-PCR relativos à infecção de célula BHK-21 por TMEV e colheita de 5 dias pós-infecção, bem como CC (célula BHK-21 não-infectada), utilizando oligonucleotídeos específicos para as regiões do gen da β-actina.....	34
Figura 9 – Figura do gel de agarose contendo amplicons resultantes da técnica de RT-PCR relativos à infecção de célula BHK-21 por TMEV e colheita de 3 dias pós infecção, bem como CC (célula BHK-21 não infectada), utilizando oligonucleotídeos específicos para a região da IRES.....	34
Figura 10 – Figura do gel de agarose das digestões de gigapreparações correspondentes as construções plasmidiais pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B com a endonuclease de restrição <i>EcoRI</i>	35

- Figura 11 – Figura do gel de agarose contendo amplicons resultantes da técnica de RT-PCR relativos utilizando como molde as construções plasmidiais pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B ou os insertos digeridos e purificados contidos nestes plasmídios..... 36
- Figura 12 – Gráfico correspondente a curva-padrão gerada para a padronização do PCR em tempo real para a região 3A3B (construção plasmidial pCR2.13A3B)..... 37
- Figura 13 – Gráfico correspondente a curva-padrão gerada para a padronização do PCR em tempo real para a região L* (construção plasmidial pCR4L*)..... 38
- Figura 14– Figura do gel de agarose das digestões de minipreparações correspondentes as construções plasmidiais pcDNA4/HisMAXL* (diferentes clones testados) com a endonuclease de restrição *KpnI*..... 40
- Figura 15 – Figura da radiografia obtida da exposição da membrana de PVDF previamente incubada por anticorpos específicos em ensaio de Western-blot para detecção da expressão de proteína L* em lisado de células HEK-293-T previamente transfectada..... 40
- Figura 16A e B – Figura da radiografia obtida da exposição da membrana de PVDF previamente incubada por anticorpos específicos em ensaio de Western-blot para avaliação do soro policlonal obtido pela vacinação de coelhos com a construção plasmidial pcDNA4/HisMAXL*..... 41

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Descrição dos antígenos utilizados experimentalmente na indução da esclerose múltipla no modelo de encefalite experimental alérgica ou autoimune e no modelo doença desmielinizante induzida pelo vírus da encefalomielite murina de Theiler..... 6
- Quadro 2 – Oligonucleotídeos iniciadores de cadeia utilizados para realização do RT-PCR visando amplificação de regiões específicas do TMEV..... 20
- Quadro 3 – Oligonucleotídeos iniciadores de cadeia e sondas utilizados para realização do PCR em tempo real visando quantificação de cópias de RNA do TMEV..... 23

RESUMO

Para testar a atividade biológica do interferon beta (INF- β) no tratamento da esclerose múltipla (EM), é importante que se tenha um modelo animal. Como a infecção pelo vírus da encefalomielite murina de Theiler (do inglês TMEV – *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus*) é capaz de evoluir para uma lesão desmielinizante similar a da EM em humanos, este estudo se propõe a estabelecer os parâmetros para avaliar a infecção do TMEV em culturas de células de rim de hamster neonato (do inglês BHK-21 – *Baby hamster kidney cells*). Para tanto foi necessário adaptar a amostra viral TMEV BeAn à cultura BHK-21, estabelecer um ensaio de RT-PCR e padronizar um PCR em tempo real. Também foi construído um vetor plasmidial contendo o gen L* do TMEV para expressão transitória em células HEK-293-T e esta construção plasmidial foi utilizada para obtenção de um soro policlonal anti-L* utilizando a metodologia de imunização genética. Como resultados foram obtidos estoques virais de células BHK-21 infectadas pelo TMEV e parte destes estoques foram avaliados quanto à presença de moléculas genômica TMEV, indicativa de replicação viral, por ensaios de RT-PCR e quantificação por PCR em tempo real. As regiões do genoma do TMEV 3A3B e L* foram aquelas que forneceram melhores resultados nesta avaliação genômica quantitativa, que deverá ser aplicada para todos os estoques TMEV BHK-21 que foram obtidos. O vetor plasmidial de expressão células HEK-293-T pcDNA4His/Max contendo o gene L* expressou com sucesso transitoriamente esta proteína heteróloga, porém não foi capaz de induzir a formação de anticorpos policlonais anti-L* em coelhos, através da técnica de imunização genética.

ABSTRACT

In order to evaluate the biologic activity of the therapeutic drug beta interferon to multiple sclerosis, an adequate animal model is necessary. In this aspect the infection of murine encephalomyelitis virus can evolve to desmyelination that is very similar to human's multiple sclerosis, the proposal of this study was the establishment of parameters to evaluate the TMEV infection in baby hamster kidney cells-BHK-21. Toward that objective was adapted the TMEV BeAn prototype sample to BHK-21 and also was established a RT-PCR and a real time PCR. Additionally, it was constructed a plasmid vector containing the L* gene of TMEV, for the expression in HEK-293-T cells. This plasmid vector was evaluated in the capacity to produce anti-L* antibodies by genetic immunization. It was possible to obtain stocks of BHK-21 TMEV infected and some of these contents were evaluated as of the quantity of genomic molecules of TMEV as an indicative of viral replication, by RT-PCR and real time PCR. The TMEV genomic regions 3A3B and L* provided best results in the quantitative evaluation. In the future, the real time PCR could be used to evaluate all the stocks that were produced. The plasmidial vector pcDNA4His/Max containing the L* gene was able to transiently express the L* protein, but unfortunately, it was not able to induce anti-L* in rabbits.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O interferon beta

O interferon beta (IFN- β) pertence à grande família de proteínas secretadas, com função de defesa do organismo contra infecções virais, na regulação da proliferação celular e na modulação da resposta imune. O IFN- β humano é uma glicoproteína (Figura 1), com 166 aminoácidos (aa) e peso molecular de 22,5 Kilodaltons (KDa). Como medicamento é principalmente utilizado para o tratamento da esclerose múltipla (EM), doença autoimune que afeta populações de diversos países (Came e Carter 1984, Kerr *et al* 2003).

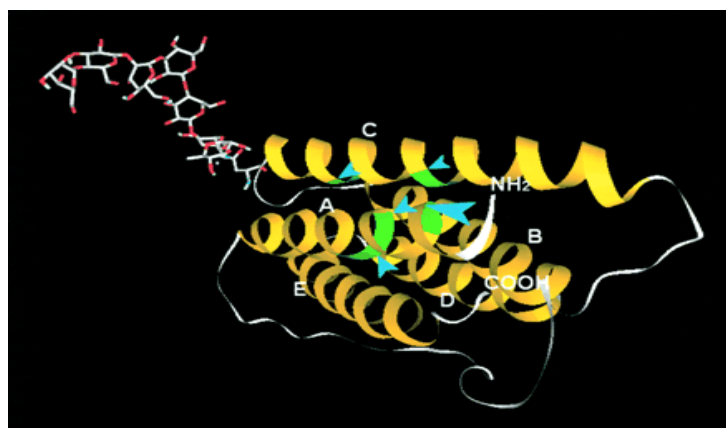


Figura 1 – Modelo esquemático da molécula do interferon beta
<http://brain.oxfordjournals.org/content/vol126/issue6/cover.dtl>

Duas formas de IFN- β recombinantes são clinicamente utilizadas (Jacobs *et al* 1996, Reder 2000). A primeira, IFN- β -1a (Avorex®, Biogen; Rebif IFN®, Serono) é produzida em células de ovário de *hamster* chinês (CHO do inglês *Chinese Hamster Ovary cells*), que embora não seja igual, apresenta um padrão de glicosilação muito similar ao IFN- β nativo. No entanto porque existem diferentes linhagens de células CHO, podem ocorrer variações do perfil de glicosilação, o que explica as diferenças na resposta do paciente aos diferentes IFN- β -1a comerciais (Jacobs *et al* 1996).

O segundo tipo, o IFN- β -1b (Betaseron®, Berlex; Betaferon®, Schering) é produzido em sistema procarioto-*Escherichia coli*. Como o sistema procarioto em questão não confere glicosilação às proteínas recombinantes produzidas, esse tipo de IFN não tem nenhuma molécula de açúcar na cadeia polipeptídica produzida. Para evitar uma incorreta formação de

ponte dissulfeto no final da cadeia, existe uma substituição na posição 17 de uma cisteína por uma serina. Também na posição 1 da cadeia (porção N-terminal), uma metionina foi deletada, tornando a cadeia polipeptídica com 165 aa e peso molecular de 18 KDa (Jacobs *et al* 1996, Reder 2000).

As diferenças químicas entre os dois tipos de IFN- β recombinantes possuem conseqüências, pelo menos teoricamente. Por exemplo, o IFN- β -1b quando combinado com a albumina do soro humano (HSA do inglês *Human Serum Albumin*) tem somente 10% da potência relativa quando comparado com IFN- β -1a. Também para o IFN- β -1a a dose recomendada é de três vezes por semana, o contrário do IFN- β -1b, o qual deve ser administrado diariamente. *In vitro* é necessário um aumento considerado da dose de IFN- β -1b para render a mesma ação observada quando IFN- β -1a é utilizado. Mas, *in vivo* não existe nenhum consenso, uma vez que ambos os tipos recombinantes exercem o mesmo papel na redução de episódios em pacientes apresentando EM, ou seja, ainda existe uma grande discussão (SPECTRINS 2001, Goodin *et al* 2002).

1.1.1. Aplicação clínica do IFN- β

O IFN- β é utilizado no tratamento da EM, doença esta que se desenvolve a partir da ativação de leucócitos T auto-reativos a peptídeos da bainha de mielina. O IFN- β também demonstrou apresentar efeitos benéficos em modelos experimentais para glomerulonefrite (GN), onde foi observado a queda de proteinúria via interleucina 10 (IL-10 livre) (Wardle 2007). Em outro estudo realizado no Reino Unido, foi avaliado o efeito do IFN- β em modelos experimentais para GN, apresentando como resultado a queda de 80% nas taxas de proteinúria em 14 dias.

No Japão o IFN- β tem sido utilizado como terapia adjuvante em alguns pacientes com glioma maligno, diminuindo a atividade da enzima O-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), responsável pelo efeito de resistência do agente quimioterápico temozolomida (TMZ). Desta forma, o IFN- β suprime a expressão da enzima MGMT pelo tumor, aumentando então a sensibilidade do glioma ao tratamento quimioterápico com o agente TMZ (Fujimaki *et al* 2007).

Estudos realizados em 2005 avaliaram os benefícios da utilização do IFN- β no tratamento do lúpus autoimune em camundongos e a diminuição da intensidade de doses e do período no tratamento de alguns pacientes com glioma maligno. Casos reportados de

pacientes infectados com o vírus da hepatite C, que realizaram seções de diálise em tratamento com IFN- β , demonstraram efetivas e seguras redução da carga viral em apenas seis semanas (Nakajima *et al* 2007, Wardle 2007).

1.1.1.1. A utilização do IFN- β para o tratamento da EM

O IFN- β está licenciado para uso no tratamento da EM. A eficácia e segurança do IFN- β foram avaliadas e comprovadas em estudo clínico de fase IV, prospectivo, aberto, realizado na Espanha. Foram acompanhados 96 pacientes com RRMS (do inglês *Relapsing Remiting Multiple Esclerosis*), por um período de dois anos, onde o IFN- β foi utilizado na rotina clínica. O tratamento com IFN- β reduziu significativamente o número de episódios característicos da doença, quando comparados com o grupo controle que não utilizava o medicamento rotineiramente (Fernandez *et al* 2003).

O tratamento com IFN- β foi bem tolerado nos dois anos de estudo, embora apresentando efeitos adversos variando de leves a moderados. A incidência de efeitos adversos relatados no estudo apresentou um taxa de significância maior no primeiro ano quando comparada ao segundo ano de estudo, não sendo relatado necrose no local de aplicação, vômitos ou reações alérgicas (Fernandez *et al* 2003).

A EM é caracterizada em indivíduos comprometidos pela presença de células T auto-reativas que destroem a camada da mielina, invadindo o Sistema Nervoso Central (SNC), comprometendo funções neurológicas e causando episódios patológicos característicos (Bar-OR *et al* 1999). Neste contexto, o IFN- β tem função moduladora das funções biológicas, principalmente diminuindo a quantidade de células imunes autoreativas (Goodin 2005).

1.2. A doença Esclerose Múltipla

A EM é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação crônica do SNC, relatada pela primeira vez por Charcot em 1868 (Javed e Reder 2006). A degeneração dos axônios é uma característica proeminente da EM sendo reconhecida como causa primária da incapacidade permanente provocada por esta doença. A EM provoca declínio drástico na qualidade de vida além da perda de produtividade de forma significativa na sociedade

humana. O custo anual com pacientes na Europa pode variar de 15 a 60 mil euros, dependendo da gravidade da doença (Gray e Dangond 2006, Javed e Reder 2006). Embora a etiologia da EM seja desconhecida, estudos epidemiológicos tem relacionado agentes infecciosos como prováveis fatores de iniciação da doença. Relatos na literatura indicam que possa existir um risco aumentado de desenvolvimento de EM em pacientes que desenvolveram anteriormente infecção pelos vírus da caxumba, sarampo e/ou pelo Epstein-bar (EBV) na idade adulta. Interessantemente, foram encontrados elevados índices de anticorpos contra EBV, ocorrendo de 15-20 anos antes do desenvolvimento em pacientes de EM. Também alguns vírus, tais como sarampo, caxumba e/ou herpes simples (HSV) tem sido isolados do cérebro de pacientes que desenvolveram EM (Welsh *et al* 2009).

O conhecimento da epidemiologia da EM é baseado em dados disponíveis principalmente dos Estados Unidos da América (EUA) e Europa. Poucos dados tem sido coletados do Brasil ou na América do Sul. A prevalência em São Paulo da EM tem sido documentada como sendo em 1997 de 15 por 100.000 de habitantes, sendo 20,1% em mulheres e 8,5% em homens. Em 1990, a incidência documentada era de 4,27 por 100.000 habitantes. O aumento da incidência documentada tem sido atribuído a disponibilidade de melhores tratamentos e do diagnóstico específico para a EM (Cristiano *et al* 2008).

Na classificação clínica da EM incluem: a recorrente remitente (RRMS do inglês *Relapsing Remitting Multiple Esclerosis*)- manifestação clínica mais comum, caracterizada por surtos que duram dias ou semanas e, em seguida, desaparecem; a primária progressiva (PPMS do inglês *Primary Progressive Multiple Esclerosis*), apresenta uma progressão de sintomas e comprometimentos (seqüelas) desde o seu aparecimento; a recorrente progressiva (RPMS do inglês *Relapsing Progressive Multiple Esclerosis*), tipo progressiva com surtos que desde o início da doença mostra a progressão clara das incapacidades geradas a cada crise; ou a forma secundária progressiva (SPMS do inglês *Secondary Progressive Multiple Esclerosis*), em que os pacientes que evoluíram da forma remitente-recorrente pioram lentamente e progressivamente. A forma mais prevalente é a RRMS (Javed e Reder 2006) e mais de 80% dos pacientes portadores de RRMS evoluem para SPMS (Fernandez *et al* 2004).

Muitos fatores têm impedido o perfeito entendimento desta complexa doença que inclui a heterogeneidade observada na sua patogênese. Com o estudo clínico é possível identificar padrões histopatológicos característicos de EM e de degeneração da bainha de mielina, aparentemente mediadas por células T ou desmielinização induzida por toxinas (Gray e Dangond 2006, Javed e Reder 2006).

1.2.1. Modelos experimentais *in vivo* para estudo da esclerose múltipla

A EM é uma doença de etiologia desconhecida e considerada de causa multifatorial. Diferentes vias podem levar a efeitos clínicos e patológicos similares à EM e evidências epidemiológicas sugerem que a mesma seja adquirida ambientalmente, sendo possivelmente uma doença viral (Marrie 2004, Friese 2006, Welsh *et al* 2009). Embora alguns vírus estejam relacionados à patogênese da EM, nenhum destes pode satisfatoriamente explicar a etiologia de todos os casos, principalmente porque a EM é também considerada uma doença autoimune. Para investigar a possível origem viral e etiologia autoimune, dois modelos *in vivo* são rotineiramente utilizados: o modelo da doença desmielinizante induzida pelo vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV-IDD do inglês *Induced Demyelinating Disease Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus*) e a encefalite experimental alérgica ou autoimune (EAE do inglês *Experimental Alergic (or Autoimmune) Encephalomyelitis*). Atualmente outros modelos animais têm sido avaliados e utilizados para o estudo da EM, tais como animais transgênicos (Rockenstein *et al* 2007) e a utilização de sagüis (sagüi-de-tufo-branco - *Callithrix jacchus*) ('t Hart e Massacesi 2009).

Ambos os modelos de TMEV-IDD e EAE foram primeiramente documentados na década de 30 (Tsunoda e Fujinami 1996). Em 1930 o TMEV foi isolado por Max Theiler do SNC de ratos com paralisia flácida espontânea dos membros inferiores. O TMEV pode ser isolado da coluna espinhal de ratos com paralisia de no mínimo 150 dias após uma infecção intranasal (Theiler 1937). Em 1952, Daniel e colaboradores relataram a desmielinização durante uma infecção por TMEV, e embora esse fato tenha recebido pouca atenção naquela época, posteriormente Lipton resgatou tal acontecimento (1975), relatando uma doença bifásica que conduzia a desmielinização. Desde então, o TMEV-IDD tem sido o modelo animal de infecção de excelência em camundongos para o estudo da EM (Lipton 1980).

O modelo EAE encefalomielite experimental alérgica, foi induzida histologicamente e clinicamente em macacos em 1933, através de múltiplas injeções intramusculares de emulsão cerebral de coelhos (Rivers *et al* 1933). Segundo Tsunoda e Fujinami (1996) Em 1940, vários autores observaram que antígenos do SNC quando eram emulsificados em adjuvante completo de Freund (composto por micobactérias mortas em uma emulsão de óleo e água) e estas emulsões eram injetadas em animais, inclusive roedores, poderiam reproduzir e produzir nestes modelos animais uma encefalomielite aguda em algumas semanas, ficando tal encefalite conhecida como EAE. Atualmente, no modelo EAE são utilizados animais *inbred* e antígenos purificados do SNC ou fragmentos peptídicos de proteínas da mielina emulsificados

em adjuvante de Freund. O quadro 1 apresenta algumas características da indução da desmielinização utilizando os modelos EAE e TMEV-IDD.

Quadro 1 – Descrição dos antígenos utilizados experimentalmente na indução da esclerose múltipla no modelo de encefalite experimental alérgica ou autoimune e no modelo doença desmielinizante induzida pelo vírus da encefalomielite murina de Theiler.

Antígeno ou vírus	Espécie animal	Curso da doença
Modelo EAE		
Todo o SNC	Camundongo, rato, macacos, porquinho da índia, etc	Aguda e/ou crônica
MBP (ou peptídeo MBP)	Camundongo, rato	Aguda e/ou crônica-RRMS
PLP (ou peptídeo PLP)	Camundongo, rato, coelho	Aguda e/ou crônica-RRMS
MOG (ou peptídeo MOG)	Camundongo, rato	Aguda ou crônica com ou sem desmielinização
Gangliosídeo	Coelho	Aguda e crônica RRMS e RPMS
S100 β	Ratos Lewis	Panencefalite aguda
Membrana endotelial cerebral	Porquinho da índia Hartley	Aguda e SPMS
Modelo TMEV-IDD		
TMEV	camundongo	Aguda e/ou crônica
MBP – proteína básica de mielina PLP – proteína proteolípídica da mielina MOG – proteína oligodentrócita da mielina		

A resposta imune conferida pelo modelo EAE é inicialmente devido a ativação de células T CD4⁺, conduzindo a uma desmielinização inflamatória, sendo neste modelo predominante. No modelo TMEV-IDD, células macrófagos, mastócitos, eosinófilos e principalmente células T CD8⁺ medeiam o processo inflamatório desmielinizante. A infecção em linhagens de camundongos suscetíveis (como discutido a seguir) resulta em uma doença bifásica do SNC que consiste numa primeira fase precoce e outra tardia desmielinizante, que aparece de 30 a 40 dias pós-inoculação intracerebral. As fases tardias e crônicas da doença no modelo TMEV-IDD fazem deste modelo um dos melhores, senão o melhor modelo experimental de EM, tanto para o estudo dos mecanismos que conduzem a EM bem como para a validação de drogas terapêuticas utilizadas no tratamento da EM (Dal Canto *et al* 1995, Tsunoda e Fujinami 1996, Nelson *et al* 2004, Oleszak *et al* 2004, Mix *et al* 2008, Welsh *et al* 2009, Merrill 2009).

1.3. O vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV)

1.3.1. Classificação - Histórico

O TMEV pertence à família *Picornaviridae* gênero *Cardiovirus* o qual possui duas espécies distintas: vírus da encefalomiocardite, que inclui a encefalomiocardite murina (EMCV do inglês *Murine Encephalomyocarditis Virus*) e Theilovirus. A espécie Theilovirus, até o momento, para alguns autores, possui dois sorotipos distintos, representados pelo TMEV e o vírus da encefalomielite humana Vilyuisk-Sibéria (VHEV do inglês *Vilyuisk Human Encephalomyelitis*) (Liang *et al* 2008). Existe uma grande controvérsia se este vírus realmente circula em humanos. A detecção de anticorpos contra o VHEV por ensaio de neutralização só foi possível em um único paciente em um total de 11 pacientes acometidos pela infecção por VHEV (Drexler *et al* 2008, Lipton 2008). Em 2003, Ohsawa e colaboradores, identificaram uma amostra viral isolada de um rato de uma colônia de ratos TMEV positivos, bastante similar ao TMEV, porém geneticamente divergente, o qual denominou de TMEV like virus (TRV do inglês *TMEV like rat virus*). Dois novos Theilovirus foram posteriormente descritos. O primeiro denominado de vírus Saffold (SAFV do inglês *Saffold vírus*), o qual foi isolado na Califórnia em 1981, de uma amostra fecal de uma criança de oito meses de idade apresentando febre de origem não identificada (Jones *et al* 2007); e o segundo, isolado de uma amostra nasofaríngea coletada de uma criança de 23 meses no Canadá em 2006, denominado de Saffold like vírus (Abed e Boivin 2008). Diante deste panorama, Liang e colaboradores (2008) propuseram classificar a espécie Theilovirus em cinco diferentes tipos denominados de TMEV, VHEV, TRV, SAFV-1 e SAFV-2, baseados na análise filogenética destas amostras. Em 2008, Chiu e colaboradores utilizando *ViroChip* microarranjo e PCR (reação da polimerase em cadeia) detectaram, em amostras de secreções respiratórias de crianças apresentando sintomas de gripe, seis positividade para o vírus os quais foram TMEV relacionados (HTVC do inglês *TMEV-like cardiovirus*). Outras amostras caracterizadas geneticamente foram identificadas como pertencentes aos tipos SAFV (relacionadas com SAFV-1 e SAFV-2), as quais foram isoladas a partir de pacientes com quadro de gastroenterite no Brasil e Alemanha, contribuindo assim para confirmar a ocorrência de *Cardiovirus* também em humanos (Drexler *et al* 2008). Recentemente, Blinkova e colaboradores (2009) isolaram de fezes de crianças com quadro de paralisia flácida aguda

não-pólio outras amostras SAFV, porém apresentando perfil molecular mais relacionado aos TRV, indicando a necessidade de mais estudos moleculares das espécies de Theilovirus.

1.3.1.1. Subgrupos de TMEV

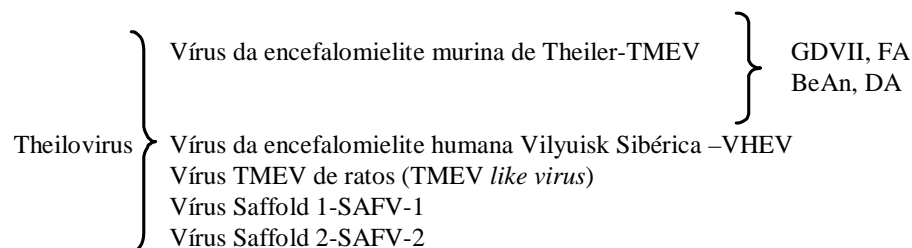
Dois principais subgrupos de TMEV têm sido descritos baseados nas diferenças quanto a neurovirulência, antigenicidade e outras características (Oleszak *et al* 2004). No primeiro subgrupo estão incluídas as amostras GDVII e FA, as quais são extremamente neurovirulentas e induzem a um quadro agudo de encefalite, não persistindo em alguns animais sobreviventes. O segundo grupo compreende as amostras BeAn e DA-Daniel Strain, sendo conhecidas como amostras originais de Theiler (TO do inglês Theiler Original). As amostras do subgrupo TO apresentam 93% de homologia de aa, sendo a doença em camundongos do tipo *Swiss James Lambert* (SJL do inglês *Swiss James Lambert*) diferente para os dois representantes deste subgrupo. A doença aguda precoce é mais acentuada para amostras BeAn do que para amostras DA. Ambas amostras induzem uma desmielinização crônica tardia, sendo a cinética da doença diferente. Em camundongos SJL inoculados com amostras BeAn, sinais como falta de equilíbrio no andar e paralisia de membros inferiores aparecem 30, 40 ou 50 dias pós-infecção, dependendo da dose da inoculação viral e da idade do animal. Em contraste, em camundongos SJL inoculados com amostras DA, os mesmos sinais aparecem somente de 140 a 180 dias após a infecção (Oleszak *et al* 2004).

Classificação do vírus da encefalomielite

Família: *Picornaviridae*

Gênero: *Cardiovirus*

Espécie: Vírus da encefalomiocardite murina- EMCV



1.3.1.1.1. A infecção pelo TMEV subgrupo TO

A figura 2 resume alguns aspectos da resposta imune induzidas em camundongos SJL (suscetíveis) e C57BL/6 (B6 resistentes), após infecção com amostras do sub grupo TO do TMEV.

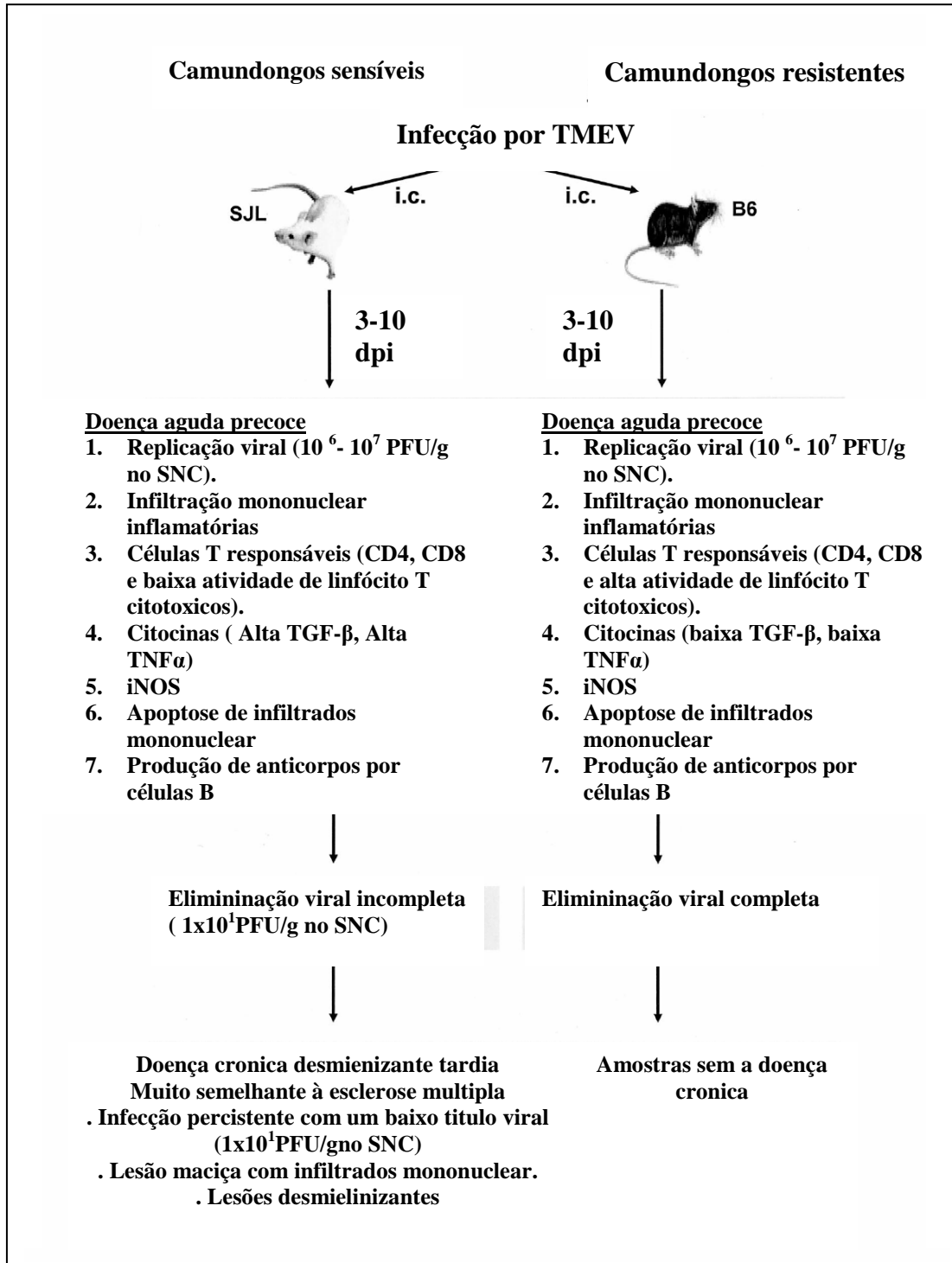


Figura 2 – Aspectos da resposta imune, induzida pela infecção do vírus TMEV em camundongos suscetíveis (SJL) e resistentes (B6) (Oleszak *et al* 2004).

A inoculação intracerebral em camundongos SJL com TMEV amostra DA induz a uma doença bifásica, consistindo de uma fase inicial precoce que ocorre de 3 a 12 dias pós-inoculação, seguida por uma fase crônica desmielinizante que ocorre de 30 a 40 dias pós-infecção, e eventualmente causando a morte do animal. Em camundongos B6, só ocorre a fase inicial da doença, devido a uma possível eliminação viral através do sistema imune do animal em aproximadamente três semanas pós-inoculação, não havendo o desenvolvimento de uma fase crônica. A fase inicial (aguda) em ambos os animais se assemelha a uma polioencefalomielite que está associada à replicação do vírus na substância cinzenta do SNC, ocasionando a destruição neuronal em nível variável. Durante esta fase, ocorre um grande infiltrado celular mononuclear no SNC consistindo de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), células da linhagem de monócitos/macrófagos, linfócitos B e algumas células do plasma. A fase aguda inicial geralmente não é aparente e dependerá de uma série de fatores de ocorrência de gravidade. Em camundongos SJL, ocorre uma falha na eliminação do vírus, levando à persistência do vírus (Oleszak *et al* 2004).

De 30 a 40 dias pós-infecção com TMEV amostra DA em camundongos SJL, ocorre uma fase crônica da infecção, com extensas lesões desmielinizantes na substância branca do SNC e infiltrados celulares mononucleares na medula espinhal, consistindo inicialmente de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$, monócitos/macrófagos, e células do plasma. Nesta fase da infecção, ocorre atrofia progressiva da medula espinhal e perda axonal com deteriorização neurológica e sinais característicos sendo detectado um baixo grau de replicação viral em macrófagos, oligodendrócitos e astrócitos na substância branca da coluna espinhal de animais infectados. A persistência da infecção é observada em camundongos SJL por um longo período (em torno de 2 anos). Em animais infectados com amostras BeAn observa-se a presença de RNA viral na coluna espinhal de 4 meses a 1 ano pós-inoculação. Até o presente momento, não há relatos na literatura que esclareçam a persistência do vírus em camundongos SJL (Oleszak *et al* 2004).

1.3.2. Estrutura do TMEV

As partículas de TMEV são não-envelopadas, apresentam um diâmetro de 28nm, capsídio com simetria icosaédrica e densidade em gradiente de sais de césio de 1,34 g/mL. O capsídio viral é constituído de 60 cópias das proteínas VP1, VP2, VP3 e VP4. São vírus bastante resistentes a agentes químicos e físicos tais como clorofórmio, éter e outros e ao pH

ácido (de 3 a 5). São estáveis ao congelamento por mais de 10 anos a -70°C e podem ser mantidos na geladeira sem perda do título viral por até 2 semanas. A inativação da partícula viral ocorre na presença de temperaturas acima de 50°C e sob a ação de luz ultravioleta. Diferentes de outros vírus, alguns TMEV são sensíveis ao tampão salina-fosfato (PBS) pH 7,2 à 37°C (Fox 2008). A figura 3 apresenta um modelo esquemático da partícula viral do TMEV.

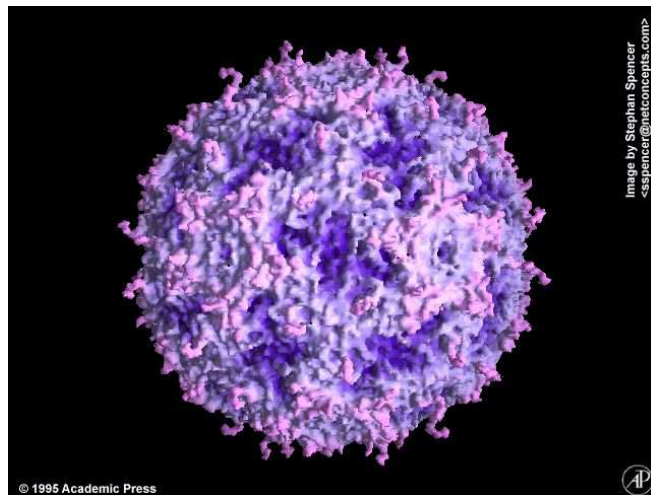


Figura 3 – Modelo esquemático da partícula viral do TMEV

<http://www.picornaviridae.com/structures/cardiovirus.htm>

O genoma viral é um ácido ribonucléico (RNA) fita simples, polaridade positiva, contendo 8.100 nucleotídeos correspondendo a uma grande fase aberta de leitura (ORF do inglês *Open Reading Frame*), que codifica para uma única poliproteína de 2.300 aa. O genoma viral não apresenta estrutura CAP, existindo uma proteína de 20 aa, básica, (VPg) ligada covalentemente à porção 5' terminal do RNA e contendo também uma cauda poli A à porção 3'. A organização genômica corresponde à clássica para o formato genômico dos picornavírus, do tipo L-4-3-4: 5' 1A(VP4), 1B(VP2), 1C(VP3), 1D(VP1), 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D-3' (Figura 4). As proteínas do capsídeo (VP1-VP4) representam o maior determinante do tropismo viral (Figura 4). As proteínas 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D (RNA polimerase viral) participam do processo de replicação viral. A proteína 2A não parece ser necessária para a replicação (Michiels *et al* 1997), sendo a real função desta proteína ainda desconhecida (Oleszak *et al* 2004, Brahic *et al* 2005).

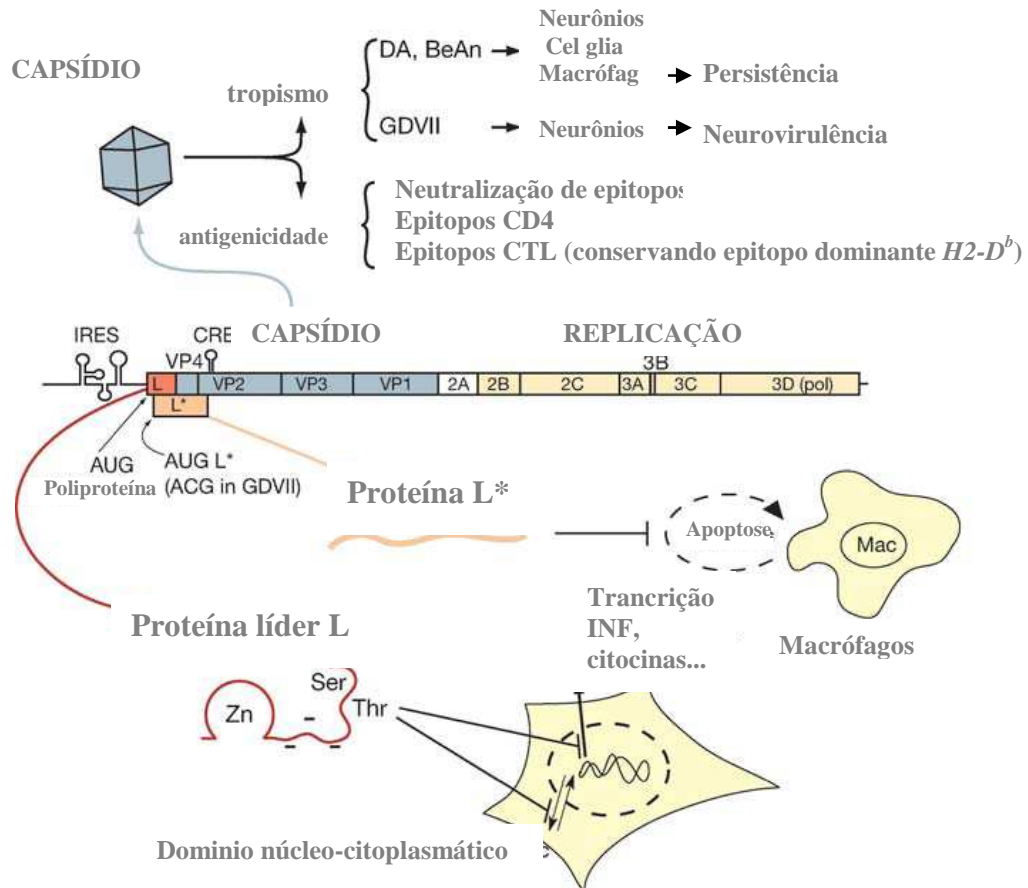


Figura 4 – Esquema representativo do genoma do TMEV (Brahic *et al* 2005).

A proteína L (proteína líder), está associada a persistência do TMEV e apresenta 76 aa. Esta proteína contém um motivo ligante de zinco (do inglês *zinc-binding motif*) e inibe a produção de IFN- α e IFN- β durante a fase inicial da infecção (Delhaye *et al* 2004; Brahic *et al* 2005). Somente para o subgrupo TO existe, além do AUG para síntese da proteína L, um segundo codon AUG independente e alternativo, localizado 13 nucleotídeos jusante (*downstream*) do AUG para L. Este segundo codon é responsável pela síntese da proteína L*. Para o subgrupo GDVII no lugar deste segundo codon iniciador existe um ACG (Figura 5) (Brahic *et al* 2005).

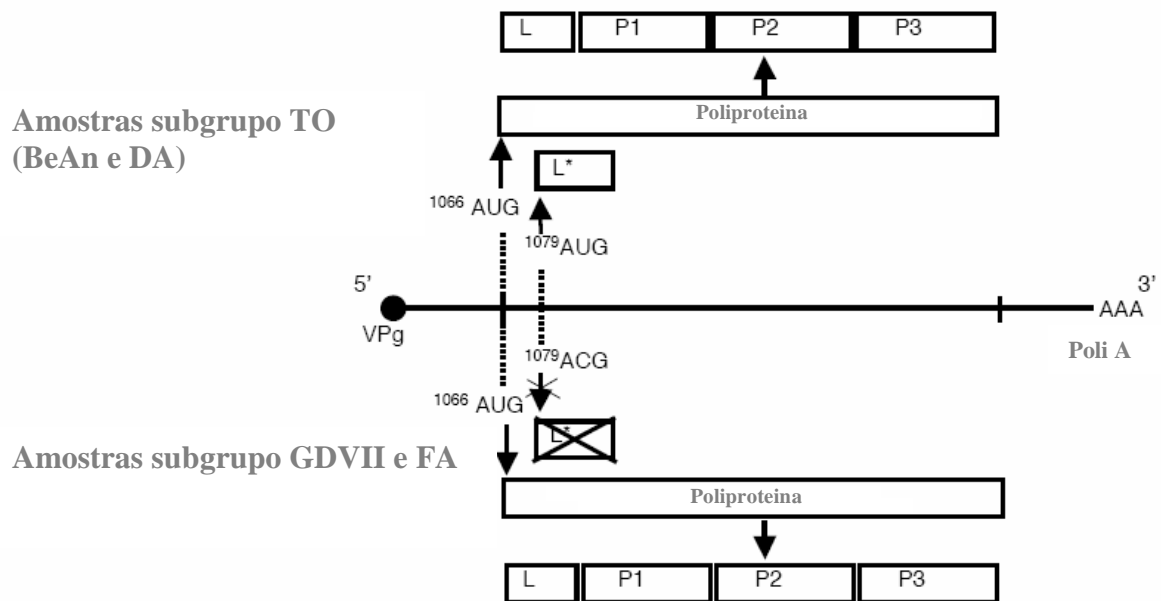


Figura 5 – Esquema representativo mostrando a presença de um AUG alternativo para tradução e síntese da proteína L*

<http://www.jneuroinflammation.com/content/3/1/19figure/F2?highres=y>

A proteína L* apresenta peso molecular de 18 KDa e inicialmente foi detectada em macrófagos e em células de rim de *hamster* neonato (BHK-21 do inglês *Baby Hamster Kidney*), infectados por TMEV. *In vivo* a proteína L* está presente nos neurônios, sendo detectada por imunohistoquímica. Também está presente em todas as amostras obtidas de animais que evoluíram para persistência. Este fato levou à hipótese de que L* está ligada a persistência viral em animais infectados. No entanto amostras contendo o codon AUG para a síntese de L* em testes *in vitro* onde o códon iniciador L* foi experimentalmente mutado para ACG, ainda é possível encontrar a presença da proteína L* em pequenas quantidades (Brahic *et al* 2005).

A tradução da proteína L* depende da seqüência de tradução interna IRES (do inglês *Structure of Internal Ribosome Entry Site*) presente na porção 5' não-codificante do genoma do TMEV e desta forma, o vírus poderia utilizar um mecanismo de síntese de L* controlada pela IRES para regular a expressão, possivelmente de acordo com um padrão célula-

específica. Uma vez que a IRES funciona de acordo com a presença de fatores celulares específicos e de acordo com o tipo de célula, poderia haver ou não expressão de L* (Brahic *et al* 2005). Tal hipótese tem sido investigada, entretanto não podendo ser provada. Até o momento, sabe-se que a replicação de TMEV-subgrupo TO em macrófagos é L* dependente. (Asakura *et al* 2007).

1.3.3. Replicação do TMEV

Os mecanismos de replicação do TMEV e, principalmente, os fatores que levam a neurovirulência e persistência viral têm sido bastante estudados. Pouco se conhece destes mecanismos a não ser aqueles ligados à replicação do gênero *Cardiovirus*. A replicação do TMEV pode ser estudada em linhagens de células permissíveis; no entanto este estudo não é fácil, porque não ocorre a completa interrupção da síntese de proteínas celulares como ocorrido com a maioria dos *Picornavirus*. Mesmo em células permissíveis à replicação pelo TMEV, tais como BHK-21 e L-929, (células de tecido areolar e adiposo de camundongo).

A transfecção por DNA complementar (cDNA) (contendo todo o genoma do TMEV) não é produtiva. O TMEV entra na célula hospedeira após a ligação por um receptor ainda não identificado nas células intersticiais. Após a entrada do vírus, RNA é traduzido em uma única poliproteína clivada numa cascata de eventos catalisada pela protease viral transcrita pela região 3C, originando produtos protéicos funcionais. O RNA viral é replicado gerando uma fita de RNA de polaridade negativa que representa um pequeno percentual do RNA total de uma célula infectada. Inoculações em culturas de células com amostras BeAn obtidas a partir do cultivo em cérebro de camundongos, não se produzem títulos virais altos, apesar da ocorrência de efeito citopático (CPE), devendo ser adaptadas a tais culturas. No entanto se inoculados no cérebro de camundongos suscetíveis, produzem grande quantidade de RNA genômico. A rota de infecção é orofecal e a disseminação para o SNC segue uma via ainda não conhecida (Monteyne *et al* 1997, Trottier *et al* 2004).

O diagnóstico da infecção é clínico e testes confirmatórios dependem de sorologia, detecção de RNA pela técnica de transcrição reversa seguida pela reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) ou isolamento viral. Atualmente, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de TMEV subgrupo GDVII, são os métodos de escolha pela simplicidade e rapidez dos mesmos (Fox, 2008).

1.4. Aspectos de relevância

O Ministério da Saúde (MS) distribui gratuitamente o IFN- β recombinante, o que onera os cofres públicos . Atualmente este medicamente é o primeiro da lista de medicamentos excepcionais mais caros para o MS (Revista de Manguinhos, 2005). No ano de 2005/2006 os primeiros contratos de transferências de tecnologia com Cuba para a produção de biofármacos (INF α e eritropoetina) em Bio-Manguinhos foram assinados. Essa linha nova de produtos abriu demanda no desenvolvimento tecnológico de produtos biofarmacêuticos, de interesse do MS. Dentre os produtos candidatos ao desenvolvimento tecnológico em Bio-Manguinhos, a obtenção do IFN- β recombinante do tipo 1a é considerada essencial. Para o estabelecimento de qualquer produto protéico recombinante visando utilização terapêutica, ensaios *in vitro* e *in vivo* são necessários, os quais preconizam a avaliação da atividade biológica.

Esta dissertação tem como objetivo introduzir as ferramentas iniciais para o estabelecimento do modelo TMEV-IDD para avaliação do IFN- β recombinante. A introdução deste modelo também tem como objetivo trazer informações adicionais que poderão contribuir para a compreensão da infecção pelo TMEV, entre eles os aspectos que levam a persistência viral e sua relação com a EM acometida em humanos.

2. OBJETIVOS

Geral:

Estabelecer os parâmetros iniciais para a avaliação da atividade biológica do IFN- β no tratamento da esclerose múltipla, utilizando a infecção pelo vírus da encefalomielite murina em células BHK-21.

Específicos:

1. Realizar a adaptação de uma amostra do vírus BeAn 8386 em cultura celular BHK-21.
2. Estabelecer a reação de transcrição reversa seguida pela reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) a fim de detectar o genoma viral em culturas celulares BHK-21 infectadas pelo TMEV.
3. Padronizar um método de PCR em tempo real visando quantificar o genoma viral de culturas celulares BHK-21 infectadas pelo TMEV.
4. Realizar a construção de um vetor plasmidial de expressão da proteína L* em células de mamíferos e avaliação da expressão transitória desta proteína em células de rim de embrião humano contendo o antígeno T do vírus símio (HEK-293-T - do inglês *Human Embryonic Kidney 293-T cells*).
5. Obter um soro policlonal anti-L* utilizando a metodologia de imunização genética.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Adaptação de uma amostra de células infectadas com o vírus BeAn 8386 obtida através da inoculação em cérebro de camundongos em cultura de célula BHK-21

3.1.1. Culturas de células BHK-21

Duas linhagens contínuas foram utilizadas neste trabalho: a linhagem contínua BHK-21 obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, gentilmente cedida por Catia Inês Costa (passagem 85) e a linhagem contínua BHK-21 adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ (código CRO 285, passagem 69). Ambas as linhagens foram mantidas em meio de manutenção Dulbecco's modificado (DMEM do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 40 µg/ml de gentamicina. As células foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C e mantidas sob um padrão de diluição em média de 1:5.

3.1.2. Adaptação da amostra BeAn8386 à cultura celular BHK-21

A amostra de vírus TMEV subgrupo TO, BeAn 8386 utilizada neste estudo, foi gentilmente cedida pelo Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, do Instituto Evandro Chagas – da cidade de Belém/Pará. Esta amostra segundo informações do próprio Dr. Pedro trata-se de um macerado cerebral de camundongos, recebida no Laboratório de Tecnologias Virais (LATEV) de Bio-Manguinhos, em fevereiro de 2008, como 2 ampolas de suspensão viral liofilizada. Uma das ampolas foi reidratada em 500µL de água estéril e a seguir de 10µL a 100µL foram inoculados em monocamada de células BHK-21, contidas em uma garrafa de 25cm², diluída em meio DMEM com 10% de SFB e 40µg/mL de gentamicina em um padrão de 1:10. Para a inoculação viral, foi utilizado o procedimento de adsorção viral por uma hora a aproximadamente 26°C, com suave agitação a cada 15 minutos. Em paralelo foi mantida uma garrafa (não-infectada) como controle celular (CC), a qual foi submetida ao mesmo procedimento de adsorção, exceto pela ausência de inóculo viral. As garrafas (infectadas e controle celular) foram mantidas a 37°C cerca de 24h a três dias, dependendo do aparecimento de efeito citopático (CPE). Somente um experimento foi conduzido a 33°C também por cerca de 24h a três dias. A seguir as monocamadas celulares foram submetidas ao procedimento de

colheita e para este procedimento foi utilizado um raspador comercial (Corning, USA). As monocamadas celulares foram ressuspensas no próprio meio, sendo recolhidas em tubos estéreis de 15mL e submetidas a 3 ciclos de congelamento (-70°C) e descongelamento (37°C). E a seguir as amostras foram estocadas a -70°C. Todo procedimento foi baseado no processo descrito por Fuller e colaboradores (2004). Passagens seriadas a partir de um primeiro estoque viral (passagem 1) até no máximo 10 passagens foram realizadas, segundo o mesmo procedimento.

3.1.3. Ensaio de titulação em placas para avaliação do título viral da amostra BeAn 8386 adaptada à cultura celular BHK-21

As células BHK-21 foram inicialmente diluídas num padrão de 1:10 em meio DMEM com 10% de SFB e 40µg/mL de gentamicina em placa de 35mm, e a seguir incubadas a 37°C por cerca de 24h ou até atingirem a confluência de aproximadamente 80%. A monocamada foi lavada com meio DMEM sem soro por duas vezes e uma determinada diluição do estoque viral em um volume final 500µL foi adicionada à placa. As células foram incubadas por 1 hora a 37°C com ocasional agitação suave e a seguir 6mL de solução ágar nobre (2% em água) e DMEM 2X (proporção de 1:1 final) foi adicionada à placa. As células foram incubadas a 33°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 5 a 6 dias. O ágar diluído foi removido cuidadosamente da placa e a seguir as células foram fixadas em metanol e coradas com solução de cristal violeta (0,8g de cristal violeta em 100mL de etanol e 400mL de água) durante 5 minutos. As placas foram lavadas com água para remoção do corante e as placas virais contadas. O número de unidades formadoras de placa foi calculado baseado no volume de inóculo adicionado a cada placa.

3.2. Estabelecimento do método de RT-PCR visando à detecção de infecção em culturas celulares BHK-21 inoculadas pelo TMEV

3.2.1. Extração de RNA total a partir de monocamadas de células BHK-21 infectadas pelo TMEV e controle celular.

Para a extração de RNA total, foi utilizado cerca de 1mL de suspensão viral obtida a partir das monocamadas de células BHK-21, infectadas ou não (CC), as quais foram previamente submetidas a *colheita*, conforme descrito no item 3.1.2. Para este procedimento foram utilizados os kits *QIAshredder spin* e *RNeasy* (Quiagen, EUA), conforme instruções dos fabricantes e brevemente descritos a seguir. Inicialmente a suspensão celular foi lisada e posteriormente removida a viscosidade por coluna *QIAshredder*. O material cromossômico foi precipitado com etanol a 70%, sendo transferido e eluído em mini-colunas do kit *RNeasy*. Os eluatos foram coletados em tubos tipo *eppendorf* e armazenados a -70°C até o momento de seu uso.

3.2.2. Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

O RNA total das amostras analisadas obtidas a partir de monocamada de células BHK-21, infectadas ou não (CC), foi submetido ao RT-PCR, utilizando-se o kit *Superscript III* (Invitrogen, EUA) conforme instruções do fabricante. Resumidamente a reação foi realizada contendo os reagentes (todos da Invitrogen) a seguir indicados.

Volume necessário para uma amostra

	1 Tubo
Tampão de reação do kit 2X.....	25 μL
Tampão de sulfato de magnésio (5mM).....	8 μL
Mix de enzimas	1 μL
Inibidor de RNase (40U/ μL).....	1 μL
Oligonucleotídeo sense (10 μM).....	1 μL
Oligonucleotídeo antisense (10 μM).....	1 μL
RNA total extraído (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).....	1 μL
Água q.s.p 50 μL	12 μL

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores de cadeia, específicos para regiões conservadas do TMEV e desenhados a partir de uma amostra referência encontrada no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information-NCBI (GenBank*, número de acesso GI: 335239) (Figura 6). O quadro 2 apresenta os oligonucleotídeos iniciadores de cadeia utilizados nas reações de RT-PCR deste trabalho.

Quadro 2 – Oligonucleotídeos iniciadores de cadeia utilizados para realização do RT-PCR visando amplificação de regiões específicas do TMEV.

Denominação dos oligonucleotídeos	Sequência (5' – 3')	Região genômica	Tamanho do amplicon (pb)
TMEVBeAn528S	GTCTAAGCCGCTCGGAATA	IRES	269
TMEVBeAn797A	ATCTTATCCACGTGGCTT TTG		
TMEVBeAnLNEW1073S	CCCGTCAGAATTGAGATATC	L*	454
TMEVBeAnLNEW1527A	CCTACTCTGTGTCAGAGAGGTTTTC		
TMEVBeAn5846S	CCCGTGAGAGTTGAGCTCTC	Região 3A3B	451
TMEVBeAn6297A	CGTTCCTTGCTGGGAAGTCGTCC		

Para cada par de oligonucleotídeos iniciadores de cadeia foi utilizada uma temperatura de anelamento diferente, conforme o valor do *T_m* (do inglês *Melting Temperature*) máximo possível para cada par. As temperaturas de anelamento para IRES, L* e região 3A3B dos pares utilizados foram respectivamente 57°C, 50°C e 61 °C. O programa utilizado esta apresentado abaixo. Para avaliar a eficiência do método de extração foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores de cadeia, específicos para o gene da β -actina (Cantelli *et al* 2009), o qual fornece um fragmento esperado de 385pb (par sense de oligonucleotídeo 5'AGGCCAACCGCGAGAAGATGA 3' e par de oligonucleotídeo antisense 5'AGCTCGTAGCTCTTCTCCAGGG 3').

1ª. Fase – RT

50°C – 30minutos

94°C – 2minutos

2ª. Fase – PCR

94°C – 15segundos

50-61°C – 1minuto

68°C – 1 minuto

4°C – 24 horas

40 ciclos

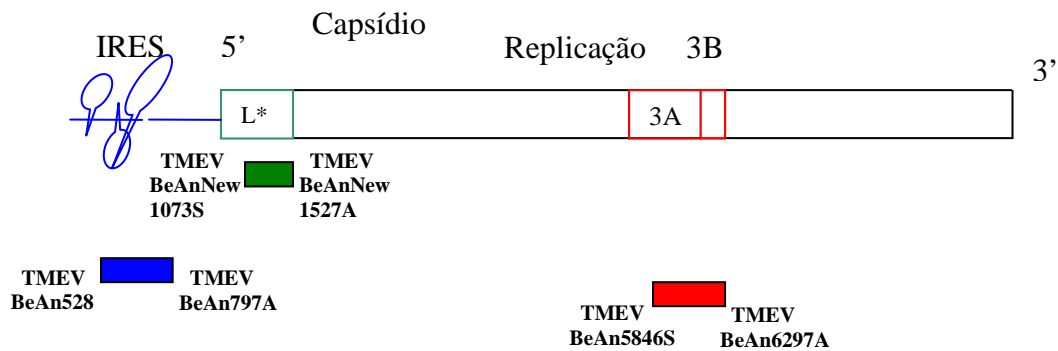


Figura 6 – Esquema representativo do genoma do TMEV e as regiões que foram amplificadas utilizando os respectivos oligonucleotídeos, iniciadores de cadeia.

3.2.3. Análise dos amplicons

Os amplicons obtidos na reação de RT-PCR foram analisados da seguinte forma: a cada 10µL de volume de cada reação de RT-PCR foram acrescentados 2µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 10% + glicerol 20% diluído em tampão tris-acetato-ácido etilenodiamino tetra-acético-EDTA 1X (ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico), e as amostras aplicadas em gel de agarose comum (Invitrogen, USA) a 1% tradicional ou agarose de baixo ponto de fusão (Promega, USA) a 2,7%, contendo brometo de etídio (0,5µg/mL). Os géis foram submetidos à eletroforese por aproximadamente 80 volts ou até que o tampão de eletroforese migrasse cerca de 3cm. A seguir o gel foi fotografado por um sistema de fotografia digital (Kodak, USA).

3.3. Padronização de um método de PCR em tempo real visando quantificar o genoma viral de culturas celulares BHK-21 infectadas pelo TMEV

3.3.1. Clonagem das sequências nucleotídicas relativas a IRES, região 3A3B e L*, do TMEV visando a obtenção de uma curva-padrão.

Os amplicons obtidos na RT-PCR conforme descrito no item (3.2.2) foram utilizados para clonagem em vetor plasmidial TA TOPO comercial denominados pCR4 (para as sequências nucleotídicas IRES e L*) e pcR2.1 (para a sequência nucleotídica 3A3B) ambos vetores TA TOPO (Invitrogen, USA). O procedimento de clonagem foi realizado conforme instruções do fabricante e a seguir 5µL de volume de cada ligação foi utilizado para transformar células bacterianas cepa Top 10 (Invitrogen, USA), preparadas para transformação

por cloreto de cálcio para tornarem-se competentes, conforme protocolo clássico descrito por Sambrook e Russel (2001). Células Top 10 transformadas foram plaqueadas em uma única placa de Petri (uma placa para cada diferente ligação) contendo meio de cultivo Luria Bertani (LB) sólido composto por meio LB líquido (10g/L de triptona + 5g/L de extrato de levedura + 10g/L de NaCl) e 15g/L de ágar. Adicionou-se também ao meio LB sólido para cada placa o antibiótico ampicilina (100µg/mL), Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (100mM) (Promega, USA) e X-Gal (40mg/mL) (Promega, USA). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e as colônias brancas crescidas foram selecionadas e passadas, cada uma separadamente, para 5mL de meio LB líquido contendo 50µg/mL de ampicilina. Como controle negativo foi também selecionada uma colônia azul a qual foi submetida ao mesmo procedimento das brancas. Os tubos foram novamente incubados por cerca de 16 horas a 37°C e a seguir foi realizada uma análise rápida conforme descrito por Rezende e colaboradores (2005). As culturas bacterianas correspondentes aos possíveis clones recombinantes foram utilizadas para realização de minipreparação plasmidial utilizando o *kit* comercial *High Pure Plasmid Isolation* (Roche, USA) conforme instruções do fabricante. Os plasmídios recombinantes (contendo as regiões de interesse IRES, 3A3B e L*) foram confirmados por clivagem com a endonuclease de restrição *EcoRI* (New England, BioLabs, USA) conforme instruções do fabricante, e a seguir estoques de bactérias contendo os plasmídios recombinantes foram preparados e mantidos a -70°C, de acordo com protocolos padrões (Sambrook e Russel 2001). As construções plasmidiais foram denominadas de acordo com o vetor plasmidial e o gene clonado como pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B. Visando obter fragmentos purificados dos insertos contidos nas construções plasmidiais e relativos ao genoma do TMEV, após as digestões com a endonucleares de restrição *EcoRI*, (New England, BioLabs, USA) conforme descrito acima, tais fragmentos foram purificados utilizando-se o *kit Wizard PCR Clean Up* (Promega, USA), quantificados utilizando a plataforma de quantificação Qubit (Invitrogen, USA) e estocados a -20°C para posterior utilização.

3.3.2. Gigapreparações plasmidiais das construções plasmidiais pCRIRES, pCRL* e pCR2.13A3B

Para obtenção de massa plasmidial purificada, volumes de aproximadamente 2,5L das culturas correspondentes a cada construção plasmidial foram utilizados para purificação com o *kit* comercial *QIAfilter Plasmid Giga* (Qiagen, USA), conforme instruções do fabricante.

Após purificação, os plasmídios foram quantificados, utilizando a plataforma de quantificação *Qubit* (Invitrogen, USA).

3.3.3. Seqüenciamento nucleotídico das construções plasmidiais pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B

O seqüenciamento nucleotídico das construções plasmidiais pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B foi realizado utilizando o *kit BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystem, USA), conforme instruções do fabricante (método de terminadores de cadeia). Após as reações de seqüenciamento, os dideoxinucleotídeos marcados e não incorporados foram purificados utilizando o sistema de coluna *Centri-Sep* (Princeton Separations Inc, USA). As reações foram analisadas pelo seqüenciador *ABI Prism 3100* (Applied Biosystems), os eletroferogramas foram avaliados pelo programa *Chromas* versão 145-95 e pelo pacote *DNASar*, este último utilizado para a construção de um *Contig* e utilizando como seqüência de referência a amostra do *GenBank* (número de acesso GI: 335239).

3.3.4. Oligonucleotídeos iniciadores de cadeia e sondas utilizadas para a PCR em tempo real

O quadro 3 apresenta as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores de cadeia e sondas utilizadas na PCR em tempo real. O desenho foi feito baseando-se na nucleotídica genômica do TMEV seqüência referência obtida no *GenBank* (número de acesso GI: 335239) utilizando-se o programa *Primer Express* versão 3.0 (Applied Biosystem, USA). Visando testar a homologia dos oligonucleotídeos iniciadores com as seqüências alvo contidas nos plasmídios pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B, foi realizada uma reação de RT-PCR convencional conforme descrito no ítem 3.2.2.

Quadro 3 – Oligonucleotídeos iniciadores de cadeia e sondas utilizados na realização do PCR em tempo real visando quantificação de cópias de RNA do TMEV

Denominação dos oligonucleotídeos/Sondas	Sequência (5' – 3')	Região genômica	Tamanho do amplicon (pb)
TMEV5857-5878S	TTGAGCTCTCTGAGGGTGAACA	3A3B	101
TMEV5958-5938A	CTAGAACCTTCCCGCCTCCTT		
TMEV528-546S	GTCTAAGCCGCTCGGAATA	IRES	289
TMEV817-797A	ATCTTATCCACGTGGCCTTTG		
TMEV1260-1280S	CCGCTCATACGCGATATTGTC	L*	72
TMEV1332-1308A	GACTGGGAGTTACTCTTGTCAGA		
TMEV1188-1210S	GACTTGGACGATGACGTCTTCTG	L*	73
TMEV1261-1240A	GGTACGTCAGTCCAGTCCATTG		
TMEV5899-5917	56-FAM /CGCGCGCCCAAAGCAAGC/ 36-TAMSp	3A3B	---
TMEV755-778	56-FAM /AGGCAGCGAACCCCCCTCCTGGTAAC/ 36-TAMSp	IRES	
TMEV1282-1306	56-FAM /TGGAACCCAGGGAACTCCTCGTC/ 36-TAMSp	L*	
TMEV1212-1238	56-FAM /CCTTCGGACACGAGCAATCAATCTCAA/ 36-TAMSp	L*	

3.3.5. Reação de síntese de DNA complementar (cDNA) para utilização como molde na reação de PCR em tempo real

Para síntese de cDNA a partir do RNA extraído das amostras de cultura de células BHK-21 infectadas com o TMEV conforme descrito nos itens 3.1.2 e 3.2.1, foi utilizada a transcriptase reversa *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV) (Promega, USA), conforme instruções do fabricante. Como molde, foram utilizados 4µL de cada RNA total extraído. Como oligonucleotídeos iniciadores foram utilizados os específicos TMEVBeAn6297A (para síntese de cDNA região 3A3B) e TMEVBeAnLNEW1527A (para a síntese de cDNA região L*).

3.3.6. Construção das curvas padrões de PCR em tempo real para o TMEV

Diluições seriadas (base de 10^{-1} a 10^{-8}) dos plasmídios pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B foram realizadas previamente utilizando-se água livre de DNase e RNase (Invitrogen, USA). Os plasmídios diluídos foram utilizados para compor a reação de PCR em tempo real utilizando o *kit TaqMan® Universal Master Mix* (Applied Biosystem, USA) conforme instruções do fabricante. O programa utilizado para padronização de todas as curvas está descrito a abaixo, com exceção somente do tempo de anelamento o qual foi diferente conforme o valor do t_m máximo possível para cada par de oligonucleotídeos. Todas as reações foram realizadas em duplicatas no equipamento 7300 real time PCR (Applied Biosystem, USA).

50°C – 2 minutos – Ativação de UNG

95°C – 10 minutos

95°C – 15 segundos

55 °C ou 57 °C * – 10 segundos

45 ciclos

65°C – 1 minuto

* = 57 °C somente para o par de oligonucleotídeos específicos para a região da IRES.

3.3.7. PCR em tempo real utilizando o cDNA obtido a partir do RNA extraído de células BHK-21 infectadas com TMEV

Para avaliação, 5µL de cada amostra de cDNA (item 3.3.4) correspondente ao RNA extraído de culturas de células BHK-21 infectadas com TMEV foram utilizados para as reações de PCR em tempo real, de acordo com parâmetros estabelecidos previamente para as curvas padrões. Todas as reações foram realizadas em duplicatas, conforme descrito no item 3.3.6.

3.4. Construção do vetor plasmidial para clonagem do gen L*

Para a construção do vetor plasmidial de expressão em células de mamífero HEK-293-T contendo o gene L* do TMEV, o vetor plasmidial comercial pcDNA4/HisMAX - versão A (Invitrogen, USA) foi utilizado. Para isso, a região codificante da proteína L* contida no vetor pCR4L* (item 3.3.1) foi transferida para o vetor de expressão por subclonagem. Gigapreparações purificadas da construção plasmidial pCR4 L* foram clivadas com a endonuclease de restrição *EcoRI* (New England, BioLabs, USA), seguindo as instruções do fabricante e o fragmento correspondente ao gene L* foi purificado do gel de agarose a 1% (preparado conforme descrito no item 3.2.3) utilizando o *kit Wizard PCR Clean Up* (Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O vetor plasmidial pcDNA4/HisMAX – versão A (Invitrogen, USA), foi clivado com a endonuclease de restrição *EcoRI* (New England, BioLabs, USA), conforme instruções do fabricante e desfosforilado utilizando a enzima fosfatase alcalina obtida de camarão (Promega, USA) (SAP do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*), conforme instruções do fabricante. Para a reação de ligação do inserto (gene L*) ao vetor, foi realizada uma reação com base em uma proporção entre vetor e inserto de 1:10, utilizando a enzima T₄ DNA ligase (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante. A Figura 6 a seguir apresenta o mapa do vetor plasmidial pcDNA4/HisMAX, indicando regiões de importância, tais como as regiões do promotor e de marcadores de seleção. Um volume de 5µL de cada ligação foi utilizado para transformar células bacterianas cepa Top 10 (Invitrogen, USA), preparadas para transformação por cloreto de cálcio para tornarem-se competentes, conforme protocolo clássico descrito por Sambrook e Russel (2001). As Células Top 10 transformadas foram plaqueadas em uma única placa de *Petri* (uma placa para cada diferente ligação) contendo meio de cultivo Luria Bertani (LB) sólido composto por meio LB líquido (10g/L de triptona [Difco, USA], 5g/L de extrato de levedura [Difco, USA], 10g/L de NaCl [Merck, Brasil]) e 15g/L de Agar (Difco, USA). Foi também adicionado ao meio LB sólido para cada placa, antibiótico ampicilina (100µg/mL) (Sigma, USA). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e as colônias crescidas foram selecionadas e passadas, cada uma separadamente, para 5mL de meio LB líquido contendo 50µg/mL de ampicilina. Os tubos foram novamente incubados cerca de 16 horas a 37°C e a seguir foi realizada uma análise rápida conforme descrito por Rezende e colaboradores (2005). As culturas bacterianas correspondentes aos possíveis clones recombinantes foram utilizadas para realização de minipreparação plasmidial utilizando o *kit* comercial *High Pure Plasmid Isolation* (Roche, USA), conforme instruções do fabricante. Os Plasmídios

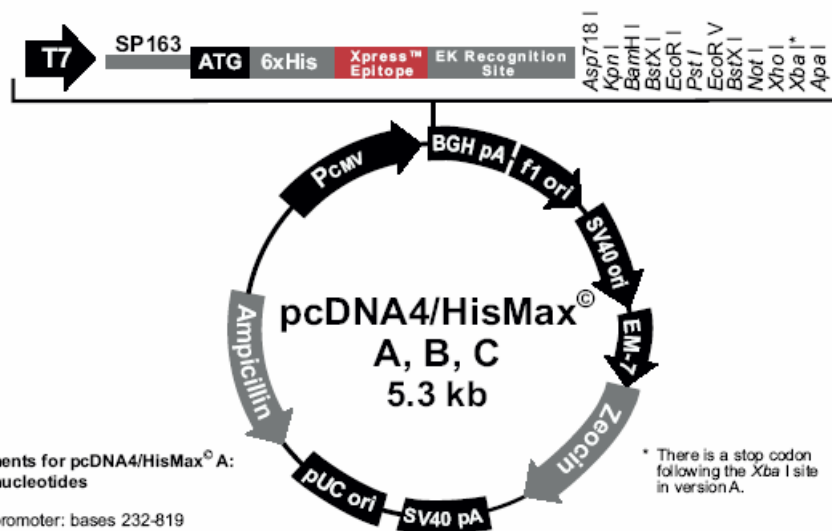
recombinantes (contendo a região codificante L*) foram confirmados por clivagem com a endonuclease de restrição *EcoRI* (New England, BioLabs, USA) conforme instruções do fabricante. Para avaliar a orientação do inserto (no sentido sense ou antisense da transcrição em relação ao promotor), a endonuclease de restrição *KpnI* (New England, BioLabs, USA), foi utilizada conforme instruções do fabricante. Para análise da clivagem, um gel a 2% foi utilizado conforme descrito no item 3.2.3.

Figura 7 – Esquema representativo do genoma do TMEV e as regiões que foram amplificadas utilizando os respectivos oligonucleotídeos, iniciadores de cadeia.

pcDNA4/HisMax[®] Vector

Map of
pcDNA4/HisMax[®]

The figure below summarizes the features of the pcDNA4/HisMax[®] vectors. The sequences for pcDNA4/HisMax[®] A, B, and C are available for downloading from our World Wide Web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (see page 19).



Comments for pcDNA4/HisMax[®] A:
5258 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819
T7 promoter/priming site: bases 863-882
QBI SP163 translational enhancer: bases 917-1079
ATG initiation codon: bases 1080-1082
Polyhistidine tag: bases 1092-1109
Xpress[™] epitope: bases 1149-1172
Enterokinase recognition site: bases 1158-1172
Multiple cloning site: bases 1172-1245
BGH reverse priming site: bases 1265-1282
BGH polyadenylation sequence: bases 1268-1495
f1 origin: bases 1541-1969
SV40 promoter and origin: bases 1996-2305
EM-7 promoter: bases 2353-2408
Zeocin[™] resistance gene: bases 2427-2801
SV40 polyadenylation sequence: bases 2931-3061
pUC origin: bases 3444-4117
Ampicillin resistance gene: bases 4262-5122

* There is a stop codon following the Xba I site in version A.

Figura 7 – Mapa do vetor plasmidial pcDNA4/HisMAX (Invitrogen, USA) utilizado para clonagem do gene L*

http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna4hismax_man.pdf

3.5. Expressão transitória da proteína L* do TMEV em células HEK-293-T

3.5.1. Ensaio de transfecção

Os ensaios de transfecção transitórias foram conduzidos utilizando o método de lipossomo não-catiônico, reagente de transfecção *FuGENE 6* (Roche, USA), conforme instruções do fabricante. As células HEK-293-T previamente mantidas em meio DMEM (Gibco, USA), com alta concentração de glicose, contendo antibióticos e 5% de SBF foram preparadas em placas de seis cavidades ou garrafas de 25 cm² um dia antes do ensaio, para conter cerca de 60-70% de confluência da monocamada. Foi utilizado cerca de 1µg da construção plasmidial pcDNA4/HisMAXL*, do plasmídeo controle negativo (pcDNA4/HisMAX) e de uma construção reporter a qual expressa o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) denominada de plasmídeo pDM14 (Mouta Junior *et al* 2003). Todos os plasmídios utilizados foram previamente purificados utilizando o *kit QIAfilter Plasmid Giga* (Qiagen, USA), conforme descrito no item 3.3.2. Cerca de cinco dias pós-transfecção, as monocamadas das células transfectadas foram lisadas conforme instruções contidas no manual do vetor pcDNA4/HisMAX (Invitrogen, USA), e/ou os sobrenadantes foram colhidos e reservados para análise. Para avaliação da eficiência de transfecção, o sobrenadante da monocamada celular transfectada com o plasmídeo repórter pDM14 foi testado para a expressão da proteína HBsAg utilizando um *kit* comercial (BioElisa, Espanha.)

3.5.2. Análise da expressão da proteína L* em células HEK-293-T

O lisado ou sobrenadante obtido das culturas de células HEK-293-T previamente transfectadas, conforme descrito no item 3.5.1, foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme descrito por Laemmli (1975). Cerca de 20µL de cada amostra foi aplicado no gel e a eletroforese foi realizada em sistema *Miniprotean III* (BioRad, USA), conforme instruções do fabricante. A seguir os géis foram transferidos para membrana *Hybond-P PVDF* (Amersham, USA) por 25 minutos a 16V, utilizando o equipamento *Semi-dry* (BioRad, USA), conforme instruções do fabricante. As membranas com proteínas transferidas foram coradas com solução de Ponceau, preparada conforme instruções do fabricante (BioRad, USA) e submetidas à reação de *Western-blot* e posteriormente revelação

por quimioluminescência, seguindo protocolos padrões e utilizando o *kit* ECL (GE-Healthcare), conforme instruções do fabricante. O anticorpo monoclonal anti-HisG (Invitrogen, USA), diluído conforme instruções do fabricante e o anticorpo monoclonal anti-HBs-AG9 (2mg/mL), diluído 1:3000 (Vianna *et al* 2006), foram utilizados como anticorpos primários na reação de *Western-blot*. Como anticorpo secundário, foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Promega, USA).

3.6. Obtenção de soro policlonal anti-L* utilizando a metodologia de imunização genética

3.6.1. Procedimento de inoculação

Todo procedimento de inoculação animal foi realizado conforme aprovação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais-CEUA, licença L-0022/08. Inicialmente o soro pré-imune foi colhido de cada animal (coelhos Nova Zelândia com peso aproximado de 1,5Kg) a ser inoculado, sendo dois dias antes do primeiro procedimento de inoculação plasmidial. Um dia antes da cada primeira inoculação plasmidial, foram administradas subcutaneamente no dorso dos coelhos, o agente químico bupivacaína (2,5µL/g de peso do animal), visando à sensibilização local. A construção plasmidial pcDNA4/HisMAXL* e o plasmídeo controle negativo pcDNA4/HisMAX, previamente purificados por gigapreparações plasmidiais conforme descrito no item 3.2. foram inoculados intramuscularmente (500µg/mL cada dose) em cada animal separadamente, perfazendo um total de cinco inoculações/doses, com intervalos de aproximadamente 7-10 dias. O soro de cada animal foi obtido em cada intervalo de inoculação, para posterior avaliação. Ao final do experimento, por punção cardíaca foi colhido o sangue total. Todos os soros foram incubados por 24 horas a 4°C logo após coleta. A seguir, os mesmos foram centrifugados por 10 minutos a 453g e o sobrenadante recuperado aliquotado e armazenado a -70°C até o momento de uso.

3.6.2. Avaliação de soro policlonal por Western-blot

Amostras dos soros policlonais obtidas conforme descrito no item 3.6.1, intermediárias e da sangria total foram avaliadas quanto à reatividade com a proteína L*

previamente imobilizada em membrana de PVDF, conforme descrito no item 5.2 (lisados). Como anticorpos primários, foram utilizados soros policlonais puros, previamente tratados conforme descrito no item 3.6.1 ou purificados por proteína A (diluídos 1:10), conforme descrito por Mouta Junior e colaboradores (2003). Resumidamente, cerca de 1mL de cada soro obtido foi diluído em tampão *Binding Buffer MAPS II* (BioRad, USA) e filtrado em mini-filtro de 0,45µg Millex-HA (Millipore, USA). A seguir 1mL da resina de cromatografia de afinidade por proteína A (BioRad, USA) foi empacotado em uma mini-coluna (BioRad, USA), que foi então lavada e equilibrada com o tampão *Binding Buffer MAPS II*. O soro diluído foi aplicado na coluna e um fluxo de pressão, utilizando bomba peristáltica (BioRad, USA) foi mantido correspondendo a 1,5mL/min. A coluna foi lavada com *Binding Buffer MAPS II* e a seguir 15 frações de 1,0mL foram coletadas. Cada fração foi avaliada em espectrofotômetro medindo-se a densidade ótica (DO) a 280 nm. A pureza das frações foi avaliada em gel SDS-PAGE aplicando cerca de 5µL de cada fração com densidade ótica (DO) alta (acima de 1.5 de DO) e os géis foram corados utilizando o corante *Coomassie Blue* preparado conforme instruções do fabricante (BioRad, USA). Cada volume de anticorpo purificado foi diluído 1/2 em glicerol e estocado a -20°C.

Como anticorpos secundários foram utilizados anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma, USA) ou anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Promega, USA) (no caso da detecção controle-reporter). Ambos conjugados foram diluídos conforme instruções do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1. Adaptação de uma amostra do vírus BeAn 8386 obtida através da inoculação em cérebro de camundongos em cultura celular BHK-21

As Figuras 7A e 7B apresentam fotografias que foram obtidas das culturas celulares BHK-21 não infectadas (7A) e infectada (7B), conforme descrito no item 1.2 de Material e Métodos, o qual está de acordo com o CPE observado para TMEV-BeAn (Hertzler *et al* 2000).



Figura 7A – Fotografia obtida da cultura celular BHK-21 não infectada após 48hs de incubação, garrafas de 25cm² (controle celular).



Figura 7B – Fotografia obtida da cultura celular BHK-21 infectada com 100 μ L de amostra TMEV-BeAn8386 recebida de Belém, após 48h de incubação.

4.2 Ensaio de titulação em placas para avaliação do título viral da amostra BeAn8386 adaptada à cultura celular BHK-21

O ensaio de titulação em placas apresentou placas indefinidas e de difícil contagem. Duas diluições foram utilizadas neste ensaio 1:2 e 1:10. Mesmo na diluição de 1:10 não foi possível considerar o resultado obtido para definição do título viral.

4.3 Estabelecimento do método de RT-PCR visando detectar infecção em culturas celulares BHK-21 inoculadas com TMEV

A Figura 8A apresenta o resultado final do processo de padronização do RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de cadeia indicados no quadro 2 de materiais e métodos. As temperaturas de anelamento selecionadas foram aquelas que forneceram como resultado final amplicons sem a presença de bandas inespecíficas (para os pares de

oligonucleotídeos IRES, L* e região 3A3B, respectivamente, 57°C, 50°C e 61°C). O RNA total extraído das amostras foi também avaliado quanto a eficiência do método de extração por amplificação do RNA total utilizado nas reações de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos, e também com oligonucleotídeos para o gene da β -actina (Figura 7B). Como controle positivo, uma amostra inicial de RNA extraída de célula BHK-21 infectada inicialmente (passagem 1, Figura 9), foi utilizada para avaliar a positividade das amostras consecutivas (passagens de 2 a 10). Tal amostra foi utilizada em todas as reações de RT-PCR

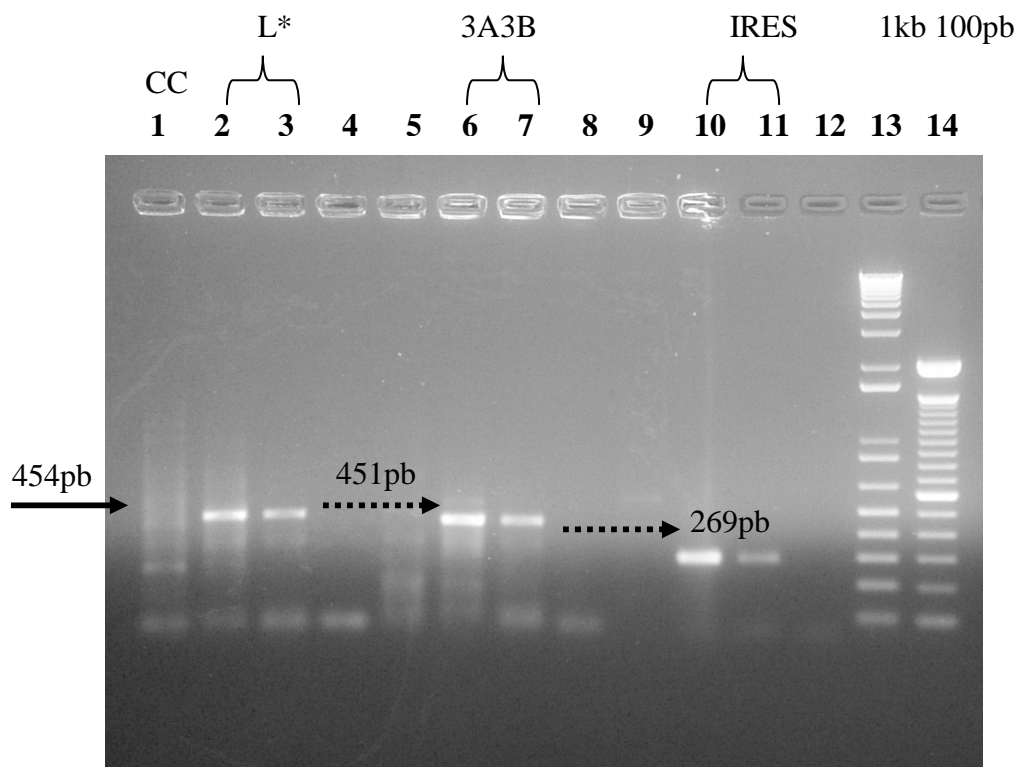


Figura 8A – Figura do gel de agarose contendo *amplicons* de RT-PCR relativos à infecção de célula BHK-21 por TMEV e colheita de 5 dias pós infecção, bem como CC (célula BHK-21 não infectada), utilizando oligonucleotídeos específicos para as regiões do genoma do TMEV. Linha 1. CC-região L*, 2.amostra infectada L*, 3.Controle positivo L*, 4. controle de mix L*; 5. CC- região 3A3B, 6. amostra infectada região 3A3B, 7.Controle positivo região 3A3B, 8. controle de mix região 3A3B; 9. CC-IRES, 10.amostra infectada IRES, 11.Controle positivo IRES, 12. controle de mix IRES; 13. Marcado de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA), 14. Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen, USA).

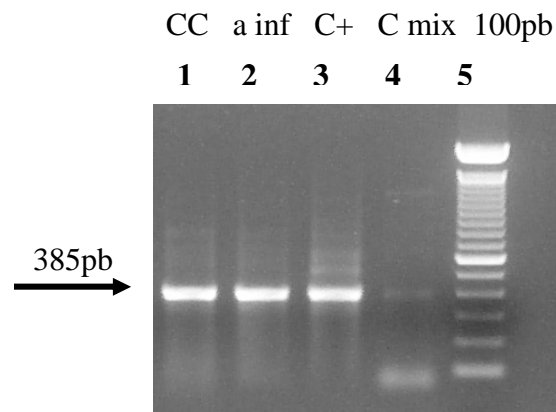


Figura 8B – Figura do gel de agarose contendo *amplicons* obtidos por RT-PCR de monocamada de célula BHK-21 5 dias após infecção por TMEV e colheita 5 dias pós-infecção, bem como CC (célula BHK-21 não infectada), utilizando oligonucleotídeos específicos para as regiões do gen da β -actina. Linha 1. CC, 2. amostra infectada, 3. Controle positivo e 4. Controle de mix. 5. Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen, USA).

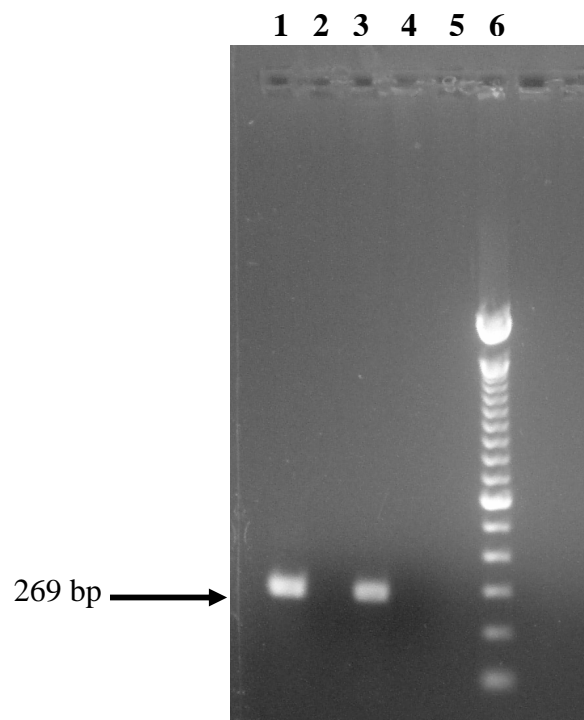


Figura 9 – Figura do gel de agarose contendo amplicons resultantes da técnica de RT-PCR relativos à infecção de célula BHK-21 por TMEV e colheita 3 dias pós infecção, bem como CC (célula BHK-21 não infectada), utilizando oligonucleotídeos específicos para a região da IRES. Linha 1. amostra infectada, 2. CC, 3. duplicata da amostra infectada, 4. Controle de Mix, 5. Sem amostra, 6. Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen, USA).

4.4. Padronização de um método de PCR em tempo real visando quantificar estoques virais de culturas celulares BHK-21 infectadas pelo TMEV

Três construções plasmidiais denominadas de pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B, respectivamente contendo as regiões da IRES, toda a região codificante da proteína L* e a região 3A3B do TMEV foram obtidas. Pelo sequenciamento e alinhamento com a sequência referência do *GenBank* (número de acesso GI: 335239) foi possível confirmar serem tais sequências as regiões específicas do TMEV. A Figura 10 apresenta o gel resultante da digestão de gigapreparações correspondentes as construções plasmidiais pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B, onde é evidenciada a presença dos insertos clonados (regiões específicas do TMEV).

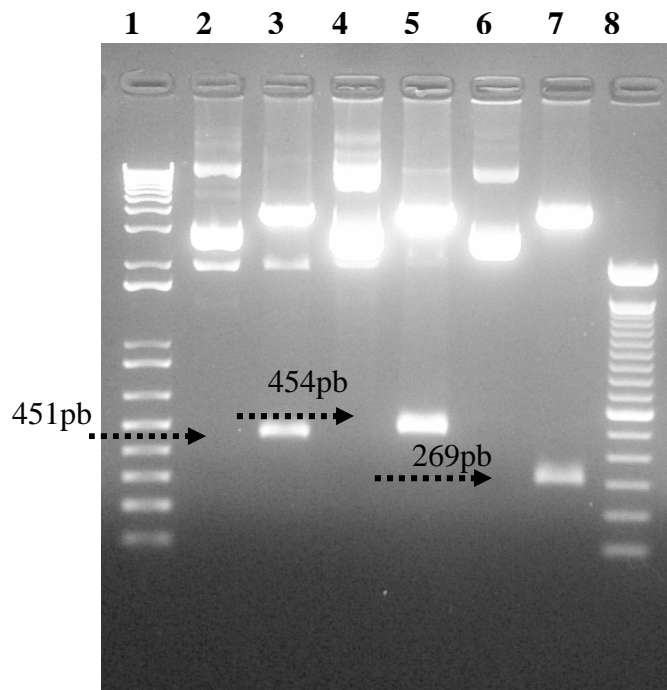


Figura 10 – Figura do gel de agarose das digestões de gigapreparações correspondentes as construções plasmidiais pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B com a endonuclease de restrição *EcoRI*. Linha 1. Marcado de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA); 2. pCR2.13A3B- não digerido, 3. pCR2.13A3B- digerido; 4. pCR4L*- não digerido, 5. pCR4L* digerido; 6. pCR4IRES não digerido, 7. pCR4IRES digerido; 8. Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen, USA).

Para obtenção das curvas-padrões, inicialmente foi realizado um ensaio de RT-PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores de cadeia (Quadro 3 do item Material e Métodos) os quais seriam utilizados nas reações de PCR em tempo real. A Figura 10 apresenta o gel resultante com os amplicons obtidos utilizando tais oligonucleotídeos. Para as reações utilizando todo o plasmídeo não se evidenciou a presença de bandas inespecíficas, com exceção de uma pequena banda inespecífica para a construção plasmidial pCR4IRES e para a construção plasmidial pCR4L* (com os oligonucleotídeos L*/2). Para as reações utilizando-se os fragmentos digeridos a partir dos plasmídios contendo o gen L*, apareceram bandas inespecíficas (utilizando dois pares de oligonucleotídeos iniciadores de cadeia desenhados para o gene L*) de intensidade relevante.

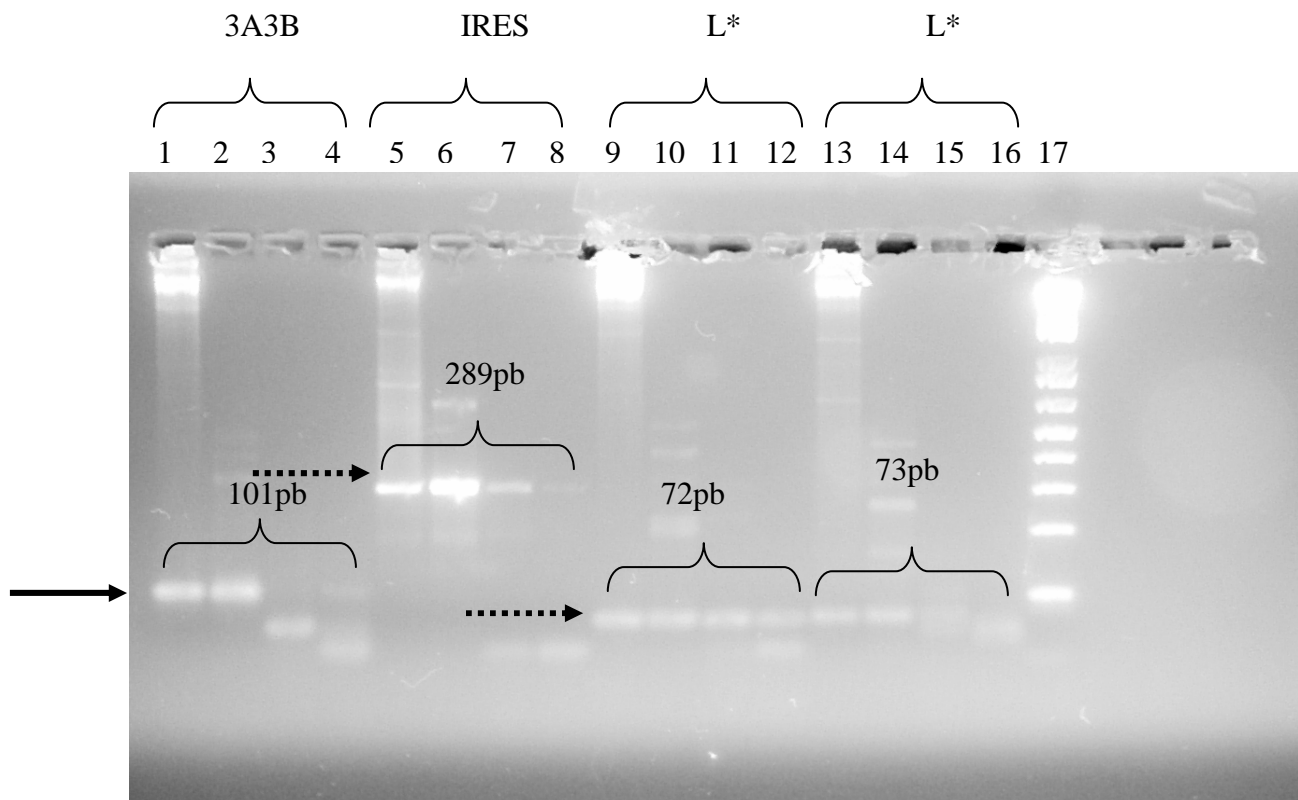


Figura 11 – Figura do gel de agarose contendo *amplicons* resultantes da técnica de RT-PCR relativos utilizando como molde as construções plasmidiais pCR4IRES, pCR4L* e pCR2.13A3B ou os insertos digeridos e purificados contidos nestes plasmídios. Linha 1. pCR2.13A3B, 2. Inseto purificado do pCR2.13A3B, 3. Controle positivo, 4. Controle de mix; 5. pCR4IRES, 6. Inseto purificado do pCR4IRES, 7. Controle positivo, 8. Controle de mix; 9. pCR4L*, 10. Inseto purificado do pCRL*, 11. Controle positivo, 12. Controle de mix (com casal de oligonucleotídeos iniciadores L*/1); 13. pCR4L*, 14. Inseto purificado do pCR4L*, 15. Controle positivo, 16. Controle de mix (com casal de oligonucleotídeos iniciadores L*/2); 17. Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen, USA).

A curva padrão obtida utilizando a construção plasmidial pCR2.13A3B mostrou uma sensibilidade de detecção de 10 cópias (moléculas) de RNA na PCR em tempo real realizada com um valor de R^2 de 0,999 (Figura 11).

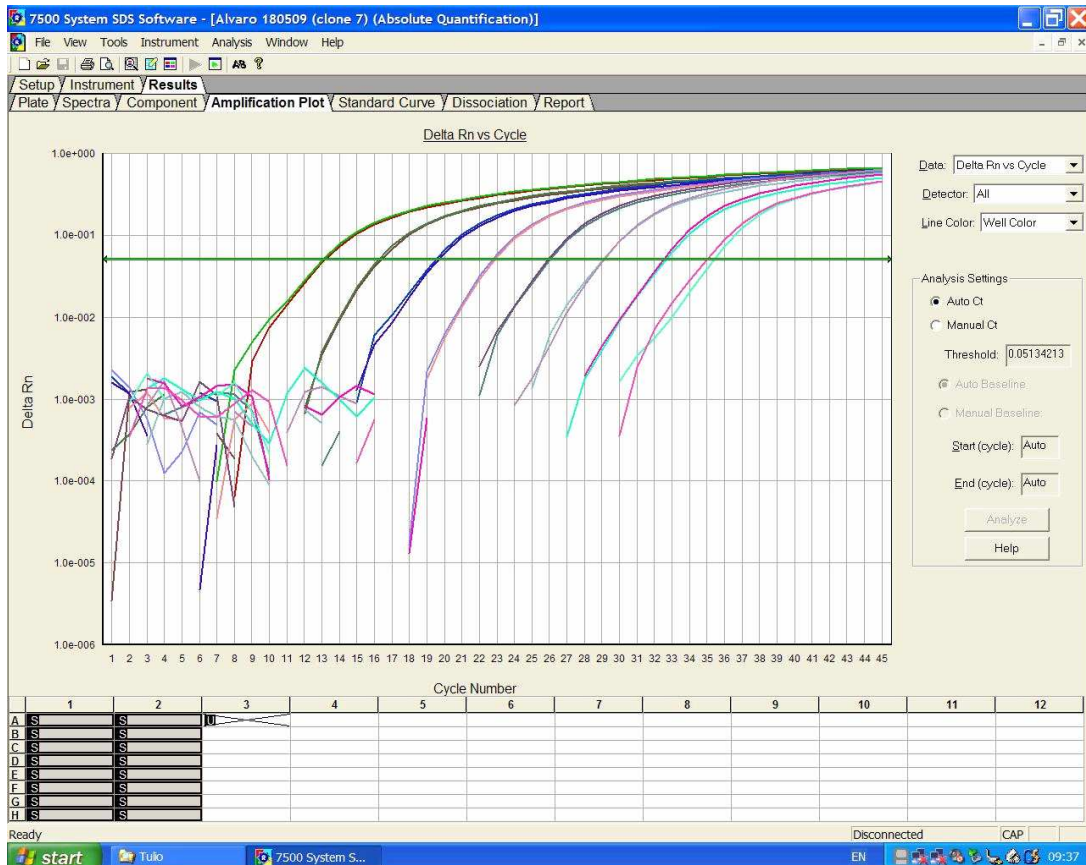


Figura 12 – curva padrão gerada para a padronização do PCR em tempo real para a região 3A3B (construção plasmidial pCR2.13A3B).

Utilizando o plasmídeo pCR4L*, a sensibilidade foi de 17 cópias (moléculas) de RNA (utilizando tanto o par de iniciadores L*/1 ou L*/2 de oligonucleotídeos iniciadores de cadeia e sondas específicas) e valor de R^2 de 0.999 (Figura 12).

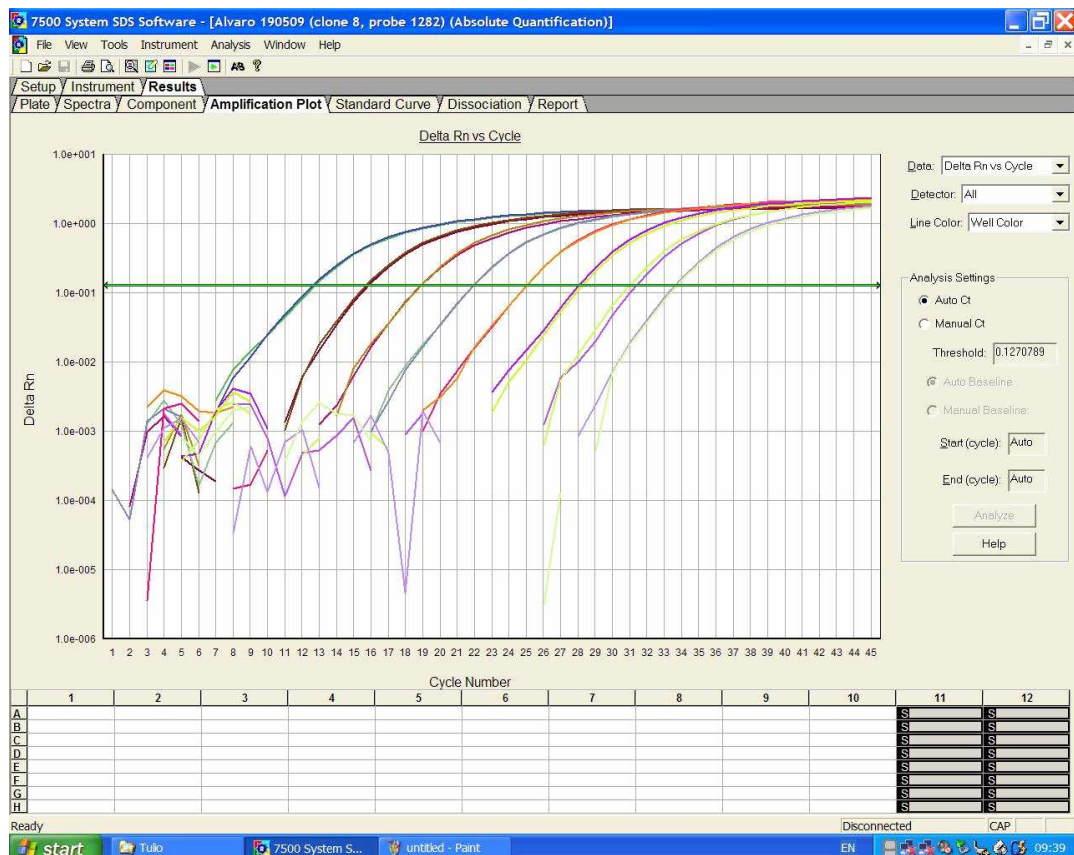


Figura 13 – curva-padrão gerada para a padronização do PCR em tempo real para a região L* (construção plasmidial pCR4L*).

Não foi possível padronizar o PCR em tempo real utilizando a construção plasmidial pCR4IRES, pois após a reação nenhuma detecção específica pode ser observada.

A quantificação de moléculas de RNA do TMEV em inóculos referentes à primeira passagem viral em células BHK-21 de colheita de quatro dias (utilizando 10 μ L do inóculo original enviado de Belém) e da segunda passagem viral em células BHK-21 de colheita de um dia foi realizada. Para a amostra de primeira passagem a quantificação foi de 2318 cópias para a região 3A3B correspondentes a 1,5 x 10⁵ cópias/mL de inóculo viral. Para o gen L* a quantificação foi de 196 cópias correspondentes a 1,2 x 10⁴ cópias/mL. Para a amostra de segunda passagem a quantificação forneceu um valor abaixo da curva. O mesmo ocorreu para

o gen L*. A quantificação foi de 2 cópias, ou seja, um quantitativo abaixo do valor mínimo da sensibilidade do método, de acordo com a curva padrão.

4.5. Clonagem e expressão do gen L* do TMEV em sistema de células de mamífero

A Figura 13 apresenta o resultado da digestão com a endonuclease de restrição *KpnI* ((New England, BioLabs, USA), da construção plasmidial pcDNA4/HisMAXL*, onde é possível observar a presença do inserto com tamanho e orientação de clonagem correto, de acordo com os mapas de restrição calculados. A construção pcDNA4/HisMAXL* (clone 6) foi selecionada e utilizada em um ensaio de transfecção transitória em células HEK-293-T, para avaliação do perfil de expressão da proteína L*. Após cinco dias de incubação das células transfectadas, visando acúmulo da proteína secretada no sobrenadante das células transfectadas, ou no espaço intracelular, as células e o sobrenadante foram avaliados pela detecção da proteína de fusão histidina em um ensaio de *Western-blot*, utilizando um anticorpo específico anti-histidina. Nenhuma proteína pode ser detectada no sobrenadante celular, no entanto na avaliação do lisado celular podemos detectar a presença da proteína L* pela detecção indireta pelo anticorpo anti-histidina. O peso molecular total detectado foi de 25kDa, correspondendo a 18kDa da proteína L* somado a 7kDa das 6 histidinas da proteína de fusão (Figura 14). O controle de transfecção (reporter), utilizado neste ensaio foi avaliado pela detecção em ELISA comercial, utilizando um *kit* para detecção da proteína expressa pelo reporter HBsAg. O resultado obtido, com uma densidade ótica (D.O.) de 1.2 para a amostra de sobrenadante de célula transfectada com o plasmídeo pDM14 e 0.100 para a amostra de sobrenadante de célula não transfectada (controle negativo), ambas com volume testado de 100µL; mostrou que a técnica de transfecção foi eficiente.

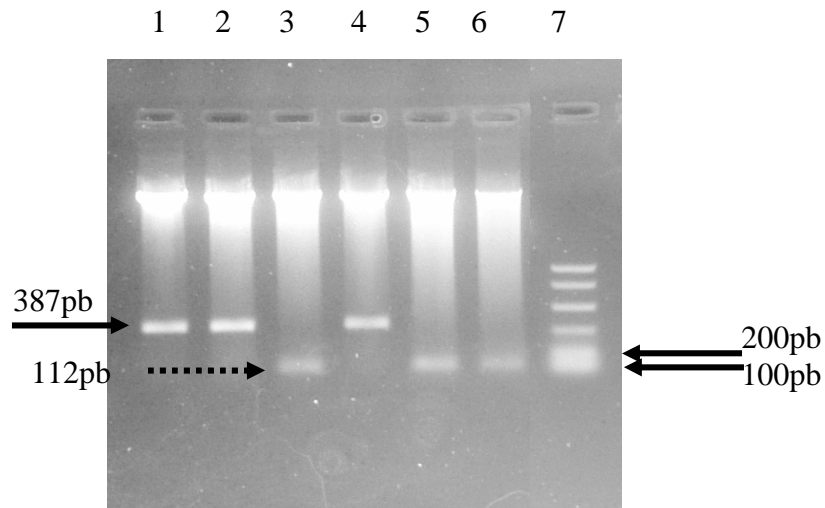


Figura 14 – Figura do gel de agarose das clivagens de minipreparações correspondentes as construções plasmidiais pcDNA4/HisMAXL* (diferentes clones testados) com a endonuclease de restrição *KpnI*. Linha 1 (orientação incorreta), 2. Clone 2 (orientação incorreta), 3. Clone 3 (orientação correta), 4. Clone 4 (orientação incorreta), 5. Clone 5 (orientação correta), 6. Clone 6 (orientação correta), 7. Marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

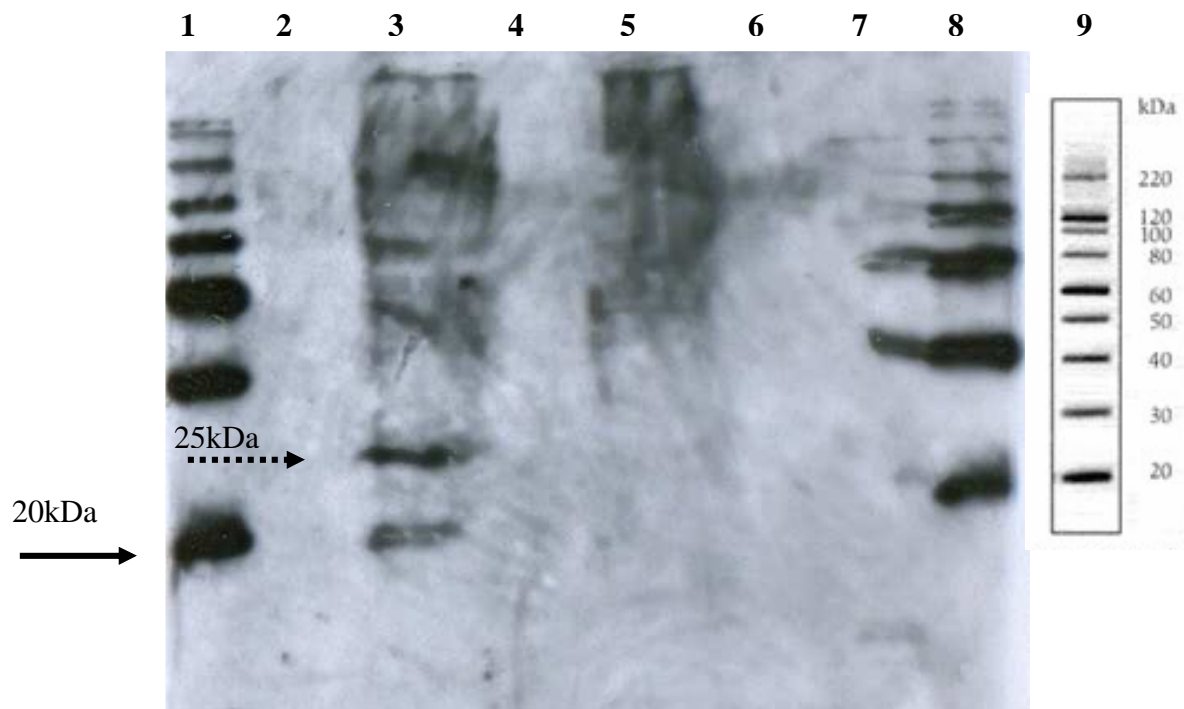


Figura 15 – Figura da radiografia por quimioluminescência obtida da exposição da membrana de *polyninylidene fluoride*-PVDF previamente incubada por anticorpos específicos em ensaio de Western-blot para detecção da expressão de proteína L* em lisado de células HEK-293-T previamente transfectada. Linha 1. Marcador de peso molecular *MagiMark™XP Western Protein Standard* (Invitrogen,USA),2. Sem amostra,3.HEK-293-T transfectada com pcDNA4/HisMAXL*, 4. Sem amostra, 5. HEK-293-T não transfectada, 6 e 7, Sem amostra, 8. Marcador de peso molecular *MagiMark™XP Western Protein Standard* (Invitrogen, USA), 9. Pesos moleculares (KDa) correspondente ao marcador *MagiMark™XP Western Protein Standard* (Invitrogen, USA).

4.6. Imunização genética visando obtenção de soros policlonais anti-L*

Os soros dos coelhos inoculados e coletados em diferentes intervalos de inoculação com o plasmídeo de expressão em células de mamífero, contendo o gen L* do TMEV (pcDNA4/HisMAXL*) ou não (controle negativo) (pcDNA4/HisMAX) foram avaliados em ensaio de Western-blot onde a proteína a ser detectada correspondeu a proteína L* recombinante expressa no sistema de células HEK-293-T conforme descrito no item 5 de resultados. Foram avaliados os soros puros e concentrados e também purificados por proteína A (concentrados e diluídos). Utilizando o soro não purificado relativo à sangria total, foi possível detectar-se uma banda somente no lisado transfectado com o plasmídeo pcDNA4/HisMAX de peso molecular em torno de 50 KDa, porém nenhuma banda em torno de 24 KDa pode ser detectada (Figura 15A e B). O mesmo resultado foi obtido, após avaliação dos soros coletados durante as inoculações.

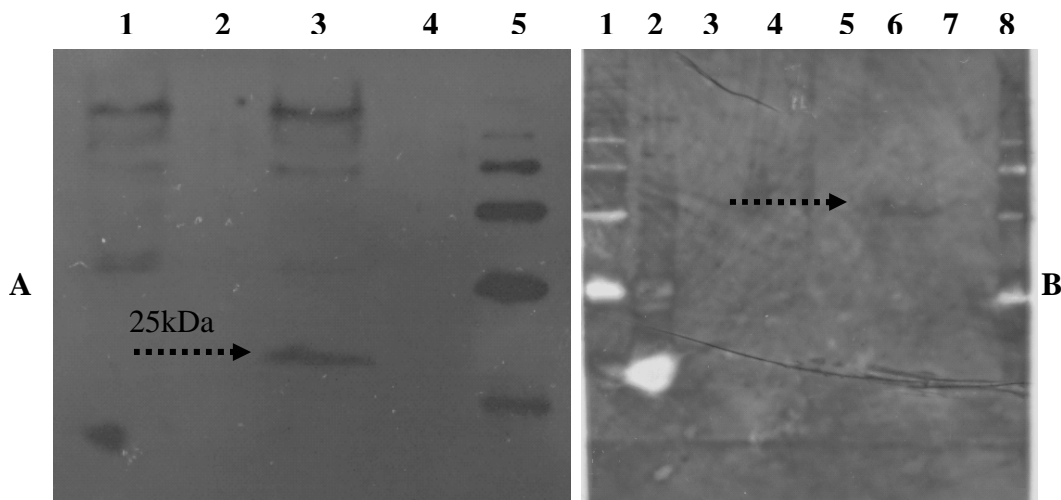


Figura 16A e B – Figura da radiografia por quimioluminescência obtida da exposição da membrana de PVDF previamente incubada por anticorpos específicos em ensaio de *Western-blot* para avaliação do soro policlonal obtido pela inoculação de coelhos com a construção plasmidial pcDNA4/HisMAXL*. Figura A-Linha 1. HEK-293-T não transfectada, 2. Sem amostra, 3. HEK-293-T transfectada com pcDNA4/HisMAXL*, 4. Sem amostra, 5. Marcador de peso molecular *MagiMark™XP Western Protein Standard* (Invitrogen, USA). Figura B-Linha 1. Marcador de peso molecular *MagiMark™XP Western Protein Standard* (Invitrogen, USA), 2. Marcador de peso molecular *MagiMark™XP Western Protein Standard* (Invitrogen, USA), 3. Sem amostra, 4. HEK-293-T não transfectada, 5. Sem amostra, 6. HEK-293-T transfectada com pcDNA4/HisMAXL*, 7. Sem amostra, 8. Marcador de peso molecular *MagiMark™XP Western Protein Standard* (Invitrogen, USA).

5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo geral trazer o conhecimento e algumas ferramentas necessárias para a implantação de um modelo de experimental animal que pudesse trazer melhores informações quanto à atividade biológica de um IFN- β humano recombinante frente à doença EM. O Instituto de Tecnologias em Imunobiológicos-Bio-Manguinhos tem com meta desenvolver e produzir este IFN- β , atendendo a uma demanda do MS que no momento prioriza o desenvolvimento e produção do mesmo. Dois modelos animais para EM são bem estabelecidos e utilizados: o modelo EAE e o modelo de infecção pelo TMEV. Pelas informações disponíveis na literatura ambos os modelos apresentam vantagens e desvantagens, porém é fato indiscutível que o modelo de infecção TMEV é o mais similar à infecção desmielinizante humana (Dal Canto 1995, Dal Canto *et al* 1996, Tsunoda e Fujimami 1996, Meagher *et al* 2007, Nelson *et al* 2004, Friese *et al* 2006, Mix *et al* 2008, Merrill 2009). Também uma possível associação viral é sugerida como causadora da EM através de estudos epidemiológicos (Welsh *et al* 2009), por isso também o modelo de infecção TMEV é o padrão ouro.

Conforme descrito na literatura (Fox, 2008) a estrutura do TMEV é relativamente simples e somente algumas proteínas estão envolvidas na indução da resposta imune. O TMEV-BeAn é um vírus que apresenta neurotropismo, isto quer dizer que a desmielinização é o principal fator da infecção. Por exemplo, o envolvimento inflamatório é limitado à substância cinzenta do SNC e o dano da camada de mielina está relacionado diretamente com a progressão da infecção e com os sinais clínicos da doença no animal. Finalmente a desmielinização é inicialmente associada com a resposta imune mediada por células. Uma severa autoimunidade para antígenos de mielina é induzida seguindo a desmielinização por célula T-vírus específicas (Kim *et al* 1999). Por estas razões, foi selecionado o modelo TMEV-IDD, no entanto surpreendentemente, o modelo poderá trazer na verdade, uma gama de informações que poderão contribuir para a compreensão da EM e por conseqüência, auxiliar no desenvolvimento de novas drogas.

A amostra TMEV recebida do Instituto Evandro Chagas-Belém, gentilmente cedida pelo Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos corresponde a um macerado cerebral de camundongos inoculados com TMEV- amostra subgrupo TO, BeAn 8386, a qual de acordo com a literatura causa uma infecção crônica com sinais clínicos específicos neurológicos no máximo 50 dias pós-infecção em camundongos suscetíveis a infecção (Oleszak *et al* 2004).

Não foi possível obter informações quanto ao título viral da amostra nem se a mesma já havia sido previamente adaptada à cultura de células, que normalmente são utilizadas para produção de partículas virais, tais como BHK-21 ou L-929. Naturalmente em culturas celulares BHK-21, amostras do subgrupo TO replicam-se mal e com um título cerca de dez vezes menor do que para amostras do subgrupo GDVII, ou seja, amostras BeAn são fastidiosas. Este fato é comprovado pela morfologia das placas virais os quais se apresentam com cerca de 2,5mm para amostras do subgrupo GDVII e com cerca de 0,5mm para do subgrupo TO (Takano-Maruyama et 2006). O mecanismo de adaptação a cultura celular das amostras do subgrupo TO é bastante crítico, complexo e limitado a repetidos ciclos de passagens virais em cultura celular permissível e purificação de placas virais para isolar somente populações não-persistentes. Isso ocorre porque naturalmente uma pequena fração de células BHK-21 resiste à infecção pelo TMEV-BeAn quando utilizado inóculo com alto valor de multiplicidade de infecção (MOI) (Hertzler *et al* 2000). De fato, alguns laboratórios têm mostrado um perfil de persistência do TMEV-TO em células infectada *in vitro*, e este padrão de persistência apresenta características específicas tais como: CPE restrito e infecção restrita a somente uma porção da monocamada celular (Libbey *et al* 2002). Roos e colaboradores (1982) infectaram persistentemente cultura celular L-929 com TMEV-DA. Pela caracterização viral as partículas não foram sensíveis à temperatura e não havia a presença de partículas interferentes. Não foram encontradas também mutações no gen codificante para a proteína do capsídeo viral. Visando obter uma população clonal em células BHK-21 de amostras TMEV-BeAn resistentes, Hertzler e colaboradores (2000) infectaram células BHK-21 a um valor de MOI de 10 por várias semanas e por quatro consecutivas passagens.

Aparentemente o aumento da temperatura não foi restritivo para a replicação viral. A colheita realizada 24 horas pós-infecção, o qual é o processo empregado pela maioria dos autores para produção de partículas virais não teve sucesso neste trabalho (Fuller *et al* 2004). Foi observado que a todas as colheitas de 3 a 5 dias fornecia amplificação de genoma viral, quando avaliado pela técnica de RT-PCR e de PCR em tempo real. É possível que passagens seriadas que foram realizadas (até dez passagens) contenham partículas virais capazes de fornecer um título viral razoável para dar continuidade a experimentos posteriores, pois não houve tempo hábil para avaliar tais estoques pelo método de PCR em tempo real. Experimentos posteriores serão necessários para avaliar outros estoques que possam ser utilizados na continuidade deste trabalho, inclusive avaliando estoques de mesmas passagens, realizados com diferentes temperaturas de incubação e/ou em diferentes momentos. Também será necessário fazer um paralelo entre quantificação de moléculas genômicas e o título viral

visando termos uma idéia do título viral de nossos estoques e assim realizar novas infecções com MOI virais baixos que evitem a persistência do vírus em culturas BHK-21.

O método de PCR convencional tornou-se extremamente útil na avaliação da presença de partículas virais. Para estabelecimento deste método foi utilizado três pares de oligonucleotídeos iniciadores de cadeia para diferentes regiões do genoma do TMEV. A escolha da região do genoma do TMEV para o desenho dos pares de oligonucleotídeos iniciadores de cadeia para as regiões IRES e 3A3B (regiões mais conservadas do genoma) foi baseada em Trottier e colaboradores (2002), o qual foi capaz de padronizar um método de PCR em tempo real para detecção da infecção persistente de TMEV no SNC de camundongos suscetíveis infectados pela amostra BeAn. Incluímos um terceiro casal que corresponde a região L*, a qual é sobreposta à região L (leader). Todos os três casais de oligonucleotídeos forneceram ampliações específicas, utilizando amostras de RNA correspondente aos estoques de cultura celular BHK-21 infectados por BeAn. A inclusão do casal de oligonucleotídeos iniciadores para L* foi visando buscar informações quanto à presença de moléculas L e L* e correlação com persistência num futuro próximo (Eyll e Michiels 2002, Delhaye *et al* 2004, Asakura *et al*, 2007).

O método de PCR em tempo real foi padronizado com uma sensibilidade de detecção alta, principalmente utilizando a região 3A3B do genoma do TMEV. Na verdade Trottier e colaboradores (2002) também tiveram um resultado similar para esta região, onde em comparação com a IRES, também utilizada por aqueles autores foi muito melhor. Neste trabalho não alcançou sucesso a amplificação em tempo real para a região IRES. A IRES é uma região que apresenta uma estrutura nucleotídica extremamente rica em grampos o que provavelmente dificulta o acesso dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas para ligação e amplificação. O mesmo fato provavelmente não ocorreu para o par de oligonucleotídeos iniciadores de cadeia para a IRES do PCR convencional porque não havia a presença de uma sonda que limitou a temperatura de anelamento (para o PCR em tempo real a *et al.*, temperatura de anelamento foi de 53°C), sendo assim utilizamos uma temperatura de 57°C.

Foi possível expressar, transitoriamente no sistema de células HEK-293-T a proteína L*, no entanto esta proteína apresentou-se expressa intracelularmente, provavelmente pela presença da histidina na porção N-terminal da proteína, o que sinaliza a mesma para um perfil de não secreção (Vianna *et al* 2003). O objetivo principal foi obter antígeno para testarmos a produção de anticorpos policlonais pelo método de imunização genética. Seria interessante se obter soros anti-L* os quais poderiam diagnosticar, principalmente em cortes histológicos a presença da proteína L*, a qual é indicativo da cronicidade e evolução para um quadro desmielinizante (Eyll e Michiels 2002, Trottier *et al* 2004, Asakura 2007). A imunização

genética é uma atrativa forma de geração de anticorpos específicos para proteínas de difícil purificação, possibilitando através da inoculação de plasmídios contendo os genes de interesse a expressão destas proteínas em modelos *in vivo* similares às nativas e desta forma, a geração de resposta imune específica frente ao antígeno (Yeung *et al* 1997, Gardsvoll *et al* 2000, Shedlock e Weiner 2000, Moonsom *et al* 2001, Tymeiu *et al* 2002, Puttikhunt *et al* 2003, Ni *et al* 2004, Bates *et al* 2006). Vários protocolos têm sido utilizados para a realização desta estratégia, os quais variam bastante com relação a dose de plasmídio injetado, o local de imunização, a utilização ou não de substâncias que seriam capazes de recrutar células do sistema imune para a região de imunização, por exemplo com a utilização da substância bupivacaína, entre outras. Recentemente nosso grupo obteve sucesso na geração de anticorpos monoclonais anti-IFN- β utilizando tal estratégia (Cantelli *et al* 2009). No entanto não foi possível a obtenção de antisoros policlonais anti-L*. Talvez tenham ocorrido problemas de detecção da proteína L* com o antisoro policlonal anti-L*, uma vez que só foi realizada a reação com anti-imunoglobulina conjugado do tipo G (anti-IgG). A expectativa é que exista a produção de imunoglobulina do tipo M (IgM) majoritariamente nos soros policlonais, como nosso grupo pode já evidenciar em experimentos envolvendo a imunização genética (Cantelli *et al* 2009).

6. CONCLUSÃO

- Foi possível detectar infecção do TMEV até a terceira passagem.
- O método de RT-PCR padronizado foi capaz de detectar o genoma viral em células BHK-21 na primeira, segunda e terceira passagem.
- O método de PCR em tempo real foi capaz de quantificar o número de cópias do genoma do TMEV em BHK-21.
- A clonagem do gen L* do vírus em plasmídeo permitiu a expressão transitória da proteína em células de mamíferos, entretanto a imunização de coelhos com tal plasmídeo não foi capaz de induzir a produção de anticorpos no soro.

7. PERSPECTIVAS

O trabalho apresentado abre uma gama de perspectivas futuras que poderão trazer, além do estabelecimento do modelo TMEV-IDD em Bio-Manguinhos, informações para o entendimento da doença EM e da biologia do TMEV. No momento as perspectivas são:

1. Redigir um manuscrito para submissão em revista internacional indexada apresentando o método de PCR em tempo real padronizado para quantificação viral em cultura celular.
2. Avaliar o perfil de expressão da proteína L* e da região 3A3B durante a replicação do TMEV em culturas celulares, por quantificando de inóculos relativos a diferentes passagens realizadas.
3. Produzir o anticorpo anti-L* utilizando como antígeno para imunização a proteína L* recombinante previamente purificada por cromatografia de imobilização de íons metálicos (IMAC).
4. Propagar o TMEV em culturas BHK-21 visando purificação de partículas virais.
5. Inocular a amostra viral purificada TMEV obtida pela inoculação em células BHK-21 em camundongos SJL/J para posteriormente avaliar a replicação viral na coluna espinhal destes animais pela técnica de PCR em tempo real e pela detecção específica de proteína L* com anticorpos específicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abed Y, Boivin G. **New Saffod cardiovirus in 3 children in Canadá.** *Emerg Infect Dis*, 2008; 14: 834-6.

AcademicpressPicornaviridae.Modelo esquemático da partícula viral do TMEV[on line].Rio de Janeiro, Brasil, 2009[consultado em 25/05/2009]; [30 telas]. Disponível em: <http://www.picornaviridae.com/structures/cardiovirus.htm>

Asakura K, Murayama H. Himeda T, Ohara Y. **Expression of L* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus in the chronic phase of infection.** *J General Virol*, 2007; 88: 2268-74.

Bar-or A, Oliveira EML, Anderson DE, Hafler DA. **Molecular Pathogenesis of Multiple Sclerosis.** *J neurol*, 1999; 100: 252-59.

Bates MK, Zhang G, Sebestyén MG, Neal ZC, Wolff JA, Herweijer H. **Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA.** *Biotechniques*, 2006; 40 (2): 199-208.

Blinkova O, Kapoor A, Victoria J, Jones M, Wolfe N, Naeem A, *et al.* **Cardioviruses are genetically diverse and cause common enteric infection in asian children.** *American Society for Microbiology*, 2009; 83 (9): 4631-41.

Brahic M, Bureau JF, Michiels T. **The genetics of the persistent infection and demyelinating disease caused by Theiler's virus.** *Ann Rev Microbiol*, 2005; 59: 279-98.

Came PE, Carter WA (eds). **Interferons and their applications.** Berlin: Springer-Verlag. 1984.

Cantelli CP, Teixeira MGM, Santos EA, Silva Jr HC, Mouta Jr SS, Pimenta MMA, *et al.* **Generation of monoclonal antibodies against human recombinant interferon beta using genetic immunisation with simultaneous expression of IgM and IgG isotypes.** *Hybridoma*, 2009; 28 (3): 211-214.

Chiu YC, Greninger AL, Kanada K, Kwok T, Ficher KF, *et al.* **Identification of cardioviruses related to Theiler's murine encephalomyelitis virus in human infections.** *PNAS*, 2008; 16(105): 14124-9.

Cristiano E, Patruco L, Rojas JI. **A systematic review of the epidemiology of multiple sclerosis in south america.** *Eur J Neurol*, 2008; 15: 1273-8.

Dal Canto MC, Melvold RW, Kin BS, Miller SD. **Two Models os multiple sclerosis: experimental allergic encephalomuelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. a pathological and imunological comparison.** *microscopy research and techniqe*, 1995; 32: 215-19.

Dal Canto MC, Kin BS, Miller SD, and Melvold RW. **Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) - induced demyelination: a model for human multiple sclerosis.** *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, 1996; 10: 453-61.

Daniels JB, Pappenheimer AM, DM, Richardson S. **Observations on encephalomyelitis of mice.** *Journal of experimental medicine*, 1952; 96:517-530.

Delhaye S, Pesch VV, Michiels T. **The leader protein of Theiler's virus interferes with nucleocytoplasmic trafficking of cellular proteins.** *J Virol*, 2004; 78:(3): 4357-62.

Drexler JF, Luna LKS, Stocker A, Almeida PS, Ribeiro TCM, Petersen N *et al.* **Circulation of 3 Lineages of a Novel Safford Cardiovirus in Humans.** *Emerging infectious diseases*, 2008; 14: (9): 1398-1405.

Eyll OV, Michiels T. **Non-AUG-Initiated Internal Translation of the L* Protein of Theiler's virus and Importance of This Protein for Viral Persistence.** *J Virol*, 2002; 10665-10673.

Fernandez O, Arbizu T, Izquierdo G, Martinez-Yelamos A, Gata JM, Luque G, De Ramon E. **Clinical benefits of interferon beta-1a in relapsing-remitting MS: a phase IV study.** *Acta neurol Scand*, 2003; 107:7-11.

Fornecimento de biofármacos ao Ministério da Saúde, terá início em fevereiro de 2006.(Biomanguinhos/Fiocruz).

Fox JG. **The mouse in biomedical research.** 2nd. New York: ed. Academic Press: 2008.

Friese MA, Montalban X, Willcox N, Bell JI, Martins R, Fugger L. **The value of animal model for drug development in multiple sclerosis.** *Brain*, 2006; 129: 1940-52.

Fujimaki T, Ishii H, Matsuno A, Arai H, Nakagomi T. **Effectiveness of interferon-beta and temozolomide combination therapy against temozolomide-refractory recurrent anaplastic astrocytoma.** *World J Surgical Oncol*, 2007; 5:85-9.

Fuller KG, Olson JK, Howard LM, Croxford JL, Miller SD. **Mouse Models of Multiple Sclerosis.** *Methods in Molecular Medicine*, 2004; 102: 345-367.

Gardsvoll H, Solberg H, Dano K, Hoyer-Hansen G. **Generation of high-affinity rabbit polyclonal antibodies to the murine urokinase receptor using DNA immunization.** *Immunol Methods*, 2000; 234: 107-16.

Goodin DS. **Treatment of Multiple Sclerosis with Human Beta Interferon.** *The International MS J*, 2005; 12: 96-108.

Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP Jr, Halper J, Likosky WH, Lublin FD *et al.* **Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the american academy of neurology and the MS council for clinical practice guidelines.** *Neurology*, 2002; 58: 169-78.

Gray SG, Dangond F. **Rationale for use of histone deacetylase inhibitors as a dual therapeutic in multiple sclerosis review.** *Epigenetics*; 2006; 67-75.

Hertzler S, Trottier M, Lipton HL. **Selection and characterization of a BHK-21 cell line resistant to infection by Theiler's murine encephalomyelitis virus due to a block in virus attachment and entry.** Journal of General Virology, 2000; 81: 2485-2490.

Invitrogen. PcDNA4/HisMAX. Expression Kit. [on line]. Rio de Janeiro, Brasil, 2007. [consultado em 28/05/2009]; [37 telas]. Disponível em:
URL: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcdna4hismax_man.pdf

Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM *et al.* **Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG).** Ann Neurol, 1996; 39: 285-294.

Javed A, Reder AT. **Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis.** Pharmacol Ther, 2006; 110: 35-56.

Jones MS, Lukashov VV, Ganac RD, Schnurr DP, **Discovery of novel human picornavirus from a pediatric patient presenting with fever of Unknown origin.** J Clin Microbiol, 2007; 45: 2144-2150.

Kim BS, PalmaJP, **Immune mechanisms of Theiler's virus-induced demyelination.** experimental and Molecular medicine, 1999; 31(3): 115-121.

Kerr IM, Costa-Pereira AP, Lillemeier BF, Strobl B. **Of JAKs, STATs. blind watchmakers, jeeps and trains.** FEBS Lett, 2003; 546: 1-5.

Laemmli, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 1970; 227: 680-685.

Liang Z, Kumar ASM, Jones MS, Knowles NJ, Lipton HL. **Phylogenetic analysis of the species Theilovirus: emerging murine and human pathogens.** J Virol, 2008; 11545-54.

Libbey JE, Tsumoda I, Fujimami RS. **Altered Cell Growth and Morphology in a BHK-21 Cell Mutant That Lacks a Receptor For Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus.** Virology, 2002; 294: 2001-1312.

Marrie AR. **Environmental risk factors multiple sclerosis aetiology.** Neurology, 2004; 3: 709-18.

Meagher MW, Johnson RR, Young EE, Vichaya EG, LuntS, Hardin EA, *et al.* **Interleukin-6 as a mechanism for the adverse effects of social stress acute Theiler's virus infection.** Brain Behav Immun, 2007; 21(8): 1083-1095.

Merrill EJ. **In vitro and in vivo pharmacological models to assess demyelination and remyelination.** neuropsychopharmacology review, 2009;34:55-73.

Mix E, Rienecker HM, Zettl UK. **Animal models of multiple sclerosis for the development and validation of novel therapies- potential and limitations.** J Neurol, 2008; 6: 7-14.

Monteyne P, Bueu JF, Brahic M. **The infection of mouse by Theiler's virus: from genetics to immunology.** Immunol Rev, 1997; 159: 163-76.

Moonsom S, Khunkeawla P, Kasinrerak W. **Production of policlonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intrasplenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein.** Immunol Lett, 2001; 76: 25-30.

Mouta SSJ, Viana COA, Ennes I, Gomes SA, Freire MS, Silva ED, *et al.* **Simple immunofinity method to purify recombinant hepatitis B surface antigen secreted by transfected mammalian cells.** J chromatogr. B, 2003; 787:303-11.

Nakajima F, Fukii M, Kitamura T, Sakaida A, Sakaguchi M, Oka H *et al.* **A case report of interferon β monotherapy for high hepatitis C viral load in dialysis patients.** Ther Apheresis and Dialysis, 2007; 11(4): 306-8.

Nelson A, Bieber AJ, Rodriguez M. **Contrasting murine models of MS.** The International MS Journal. 2004; 11: 95-9.

Ni Y, Ma K, Ni J, Zheng X, Wang Y, Xiong S. **A rapid and simple approach to preparation of monoclonal antibody based on DNA Immunization.** Cell Mol Immunol, 2004; 1(4): 295-9.

Ohsawa K, Watanabe Y, Miyata H, Sato H. **Genetic Analise of a Theiler-Like virus isolated from rats.** Comp. Med, 2003; 53:44-9.

Oleszak EL, Chang JR, Friedman H, Katsetos CD, Platsoucas CD. **Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis.** Clin Microbiol Rev, 2004; 174-207.

Oxfordjournals. Modelo esquemático da molécula do interferon beta[on line].Rio de Janeiro, Brasil, 2009[consultado em 25/05/09]; [35 telas]. Disponível em: <http://brain.oxfordjournals.org/content/vol126/issue6/cover.dtl>

Puttikhunt C, Kasinrerak, Srisa-ad S, Duangchinda T, Silakate W, Moosom S, Sittisombut N, Malasit P. **Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization.** J Virol Methods, 2003; 109: 55-61.

Reder AT (ed). **Interferon Therapy of Multiple Sclerosis.** New York: Marcel Dekker, Inc., 2000.

Rezende CAF, Moraes MTB, Matos DCS, Mcintosh D, Armoa GRG. **Humoral response and genetic stability of recombinant BCG expressing hepatitis B surface antigens.** J Virol Methods, 2005; 125: 1-9.

Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP, **Observations oh attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys.** J Exp Med, 1933; 58: 39-53.

Rockenstein E, Crews L, Masliah E. **Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development.** Advanced drug delivery, 2007; 59: 1093-102.

Ross RP, Richards OC, Green J, Ehrenfel E, **Characterization of s Cell Culture Persistently Infected With the DA Strain of Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus.** J Virol, 1982: 1118-1122.

Sambrook J, Russel DW. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2001.

SPECTRIMS Study Group. Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-beta-1a in MS. **Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: clinical results**. *Neurology*, 2001; 56: 1496–1504.

Shedlock DJ, Weiner DB. **DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity**. *J Leukoc Biol*, 2000; 68: 793-806.

Takano-Maruyama M, Ohara Y, Assakura K, Okuwa T. **Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus Leader Protein Amino Acid Residue 57 Regulates Subgroup-Specific Virus Growth on BHK-21 Cells**. *J Virol*, 2006; 12025-31.

Theiler M. **Spontaneous encephalomyelitis of mice: a new virus disease**. *J. Gen Virol*, 1937; 68:705-19.

Trottier M, Schlitt BP, Kung AY, and Lipton HL. **Transition from Acute to Persistent Theiler's Virus Infection Requires Active Viral Replication That Drives Proinflammatory Cytokine Expression and Chronic Demyelinating Disease**. *J Virol*. 2004; 78:12480–8.

Trottier M, Schlitt BP, Lipton HL. **Enhanced detection of Theiler's virus RNA copy equivalents in the mouse central nervous system by real-time RT-PCR**. *Journal of Virological Methods*, 2002; 103: 89-99.

Tsunoda I, Fujimami RS. **Two models for multiple sclerosis: experimental allergic encephalomyelitis and Theiler's murine encephalomyelitis virus**. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1996; 55(6): 673-86.

Tymeiu S, Wijkhuisen A, Sagot MA, *et al*. **Use of DNA immunization to produce polyclonal antibodies against the native human neurokinin-1 receptor for substance P**. *J Neuroimmunol*, 2002; 128: 23-30.

'tHart BA, Massacesi L. **Clinical, pathological, and immunologic aspects of the multiple sclerosis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*)**. *Neuropathol Exp Neurol*, 2009; 68 (4): 341-55.

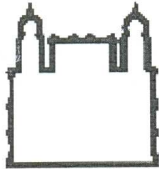
Vianna COA, Mouta SSJ, Martins MGT, Batoreu NM, Queiroz JL, Gomes SA *et al*. **Evaluation of murine monoclonal antibodies targeting different epitopes of the hepatitis B virus surface antigen by using immunological as well as molecular biology and biochemical approaches**. *J Immunol Methods*, 2006; 313: 38-47.

Wardle EN. **Interferon-Beta for Glomerulonephritis**. *Saudi Journal of kidney Diseases and Transplantation*, 2007; 18: 333-6.

Yeung SCJ, Anderson J, Kobayashi K, Oka K, Chan L. **Production of rabbit polyclonal antibody against apobec-1 by genetic immunization**. *J Lipid Res*, 1997; 38: 2627-32.

Welsh CJ, Steelman AJ, Mi W, Young RC, Storts R, Welsh TH *et al*. **Neuroimmune interactions in a model of multiple sclerosis**. *Neuroimmunomodulation*, 2009; 1153: 209-219.

ANEXOS



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “**Obtenção do Interferom Beta Humano Recombinante para uso Terapêutico**” sob a responsabilidade da **Dra. Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza**, foi licenciado pelo nº **L-0022/08** e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em 18/03/2008. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 18 de março de 2012.

Rio de Janeiro, 18 de março de 2008.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'O. A. P.', is written over a faint, circular official stamp.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ