

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANILO BRETAS DE OLIVEIRA

**NÍVEL DE mRNA DOS INTERFERONS TIPO I E III E DE
GENES ESTIMULADOS POR INTERFERON EM PBMCs DE
PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA**

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientador: Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida

Belo Horizonte Setembro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DANILO BRETAS DE OLIVEIRA

**NÍVEL DE mRNA DOS INTERFERONS TIPO I E III E DE
GENES ESTIMULADOS POR INTERFERON EM PBMCs DE
PACIENTES COM ESCLEROSE SISTÊMICA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Co-orientador: Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida

Belo Horizonte Setembro de 2011

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMO	9
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1 INTERFERONS.....	11
1.1.1 INTERFERONS TIPO I.....	16
1.1.2 INTERFERONS TIPO II.....	18
1.1.3 INTERFERONS TIPO III.....	19
1.2 AUTOIMUNIDADE E INTERFERONS	21
1.3 ESCLEROSE SISTÊMICA	25
II. JUSTIFICATIVA	30
III. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	35
V. MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1 CÉLULAS	38
5.1.1 A549	38
5.1.2 VERO	38
5.1.3 PBMCs	39
5.2 VÍRUS.....	40
5.2.1 VSV	40
5.2.2 EMCV	40
5.3 INTERFERON α	40
5.4 EXTRAÇÃO DE RNA CELULAR.....	40

5.5 TRATAMENTO COM DNASE.....	41
5.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	41
5.7 INFECÇÃO COM VSV.....	41
5.8 TRATAMENTO COM IFN α	42
5.9 FRACIONAMENTO DE PBMCS.....	42
5.10 PBMCS ESTIMULADOS COM IFNS (cDNA).....	43
5.11 PCR EM TEMPO REAL.....	43
5.12 OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	44
5.13 TITULAÇÃO DE IFN NO SORO.....	46
5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
VI. RESULTADOS.....	47
6.1 NÍVEL DE mRNA DOS IFNS α , β , λ 1 E λ 2/3.....	48
6.2 TITULAÇÃO DE IFNs NO SORO.....	50
6.3 NÍVEL DE mRNA DOS ISGS 6-16, MXA E 2`5`OAS.....	51
6.4 NÍVEL DE mRNA DE IFN β E IFN λ 1 EM PBMCS TRATADOS COM IFN β OU IFN λ 1.....	53
VII. CONCLUSÕES E DISCUSSÃO.....	56
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
IX. ANEXOS.....	72
9.1 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Representação esquemática dos TLRs e seus ligantes.....	12
FIGURA 2- Representação esquemática da indução de IFNs por vírus e da atividade de IFNs.....	13
FIGURA 3- Representação esquemática das vias de sinalização por IFNs.....	17
FIGURA 4 – Representação esquemática da provável via pelas quais uma doença autoimune pode surgir e se perpetuar.....	23
FIGURA 5 - Lesões características da SSc.....	26
FIGURA 6 - Lesões características da síndrome CREST.....	27
FIGURA 7 - Nível basal de mRNA dos IFNs tipo I e tipo III.....	49
FIGURA 8 – Nível de IFNs no soro.....	50
FIGURA 9 - Nível basal de mRNA de ISGs e IRF-7.....	52
FIGURA 10- Nível de mRNA de IFNs após estímulo com IFN β humano.....	54
FIGURA 11 Nível de mRNA de IFNs após estímulo com IFN λ humano.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Exemplos de ISGs responsáveis pela ação antiviral e antitumoral na indução por IFNs.....	15
TABELA 2- Informações sobre os pacientes com SSc doadores do banco de cDNA do laboratório de vírus.....	39
TABELA 3- Informações sobre os indivíduos que consentiram participar da pesquisa.....	43
TABELA 4- Relação dos oligonucleotídeos que foram utilizados neste trabalho.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ng - nanograma

µg- Micrograma

µL - Microlitro

2'5'OAS – 2'5' oligoadenilato sintetase

6-16 – Proteína induzida por IFN α, 6

aa- Aminoácidos

cDNA – DNA complementar

CO₂ – Dióxido de carbono

COEP UFMG – Comitê de ética da universidade Federal De Minas Gerais

DNA- Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Dideoxynucleotídeo trifosfato

ds – Dupla fita

DTT - Dithiothreitol

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

g – Força gravitacional

GAS- Seqüências ativadas por IFN γ

huIFNAR2b- Forma curta da cadeia 2 do receptor celular de interferon

huIFNAR2c- Forma longa da cadeia 2 do receptor celular de interferon

huIFNAR2c- Forma solúvel da cadeia 2 do receptor celular de interferon

IFN - Interferon

IFN LR1- Cadeia 1 do receptor de interferon tipo III

IFNAR- Receptor de interferons tipo I

IFNAR1- Cadeia 1 do receptor de interferons tipo I

IFNAR2- Cadeia 2 do receptor de interferons tipo I

IFNGR - Receptor de interferon tipo II

IFNGR - Receptor de interferons do tipo II

IFNGR1- Cadeia 1 do receptor de interferon tipo II

IFNGR2- Cadeia 2 do receptor de interferon tipo II

IFNLR - Receptor de interferons do tipo III

IL - Interleucina
IL-10R2- Receptor 2 de interleucina 10
IRF – Fator regulatório de interferon
ISG – Gene estimulado por interferon
ISGF3- Fator de transcrição estimulado por interferon 3
ISRE – Elemento regulatório de genes estimulados por interferons
JAK – Janus quinase
LPS- Lipopolissacarídeo
MEGA – Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
mL – Mililitro
mRNA – RNA mensageiro
MxA – Homólogo humano para o gene de resistência a myxovirus 1 murino
NK- Células natural killer
PAMPS – Padrões moleculares associados à patógenos
PBMCs - Células periféricas mononucleares do sangue
PBS – Solução salina fosfatada
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PKR – Proteína quinase dependente de RNA dupla fita
PRRs- Receptores que reconhecem padrões moleculares
RNA- Ácido ribonucléico
RPMI- Roswell Park Memorial Institute
RT – Transcrição reversa
SFB – Soro fetal bovino
SOCS – Supressor de sinalização por citocinas
ss – Fita simples
SSc – Esclerose sistêmica
STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição
TLR – Receptor do tipo toll
TNF – Fator de necrose tumoral
TYK –Tirosina quinase

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

A esclerose sistêmica (SSc) é uma doença complexa do tecido conjuntivo que apresenta fibrose cutânea e visceral progressiva. Alterações microvasculares proeminentes e a presença de anormalidades imunes celulares e humorais também são características desta doença. A SSc pode ser subdividida em duas grandes formas, a difusa e a limitada, ambas são caracterizadas pela presença de autoanticorpos e fibrose tecidual. A identificação de genes diferencialmente expressos na SSc é de extrema importância para a elucidação da etiopatogênese da doença e o estabelecimento de novas alternativas terapêuticas, pois a expressão alterada de genes ligados a sistema imune pode refletir em anormalidades imunes. Os interferons (IFNs) são citocinas que além de regularem a resposta imune inata e adquirida, estão envolvidos em processos de autoimunidade. Assim sendo o conhecimento do papel dos IFNs e de seus genes efetores nas diversas doenças autoimunes é de fundamental importância para que se possa conhecer os mecanismos de patogênese dessas doenças e possíveis perspectivas de tratamentos. Neste trabalho foi analisada o nível de mRNA de genes ligados a sistema IFN em um grupo de pacientes com SSc difusa. Quando foi comparado o nível de mRNA dos IFNs $\alpha 2$, β , $\lambda 1$ e $\lambda 2/3$ foi observado que o nível basal de mRNA de IFN $\alpha 2$ e β esta aumentado nos pacientes com SSc quando comparado com o grupo controle. Por outro lado o nível de mRNA dos IFNs $\lambda 1$ e $\lambda 2/3$ não foi diferente entre os grupos estudados. Também foi observado um aumento no nível basal do mRNA do ISG (gene estimulado por interferon) 2'5'OAS genes nos pacientes com SSc. Estes resultados indicam uma alteração no nível de mRNA de genes do sistema IFN em pacientes com SSc. Este perfil de alteração ainda não foi descrito em outras autoimunidades, sendo assim uma assinatura desta doença.

I.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTERFERONS

Os interferons (IFNs) são citocinas que surgiram evolutivamente a milhões de anos atrás. O gene ancestral de IFNs possuía íntrons e possivelmente surgiu a partir de um gene de interleucina (IL). Este gene, semelhante ao gene de IL 28 (IFN λ 2), sofreu duplicações ao longo da evolução dando origem a outros subtipos. Estas duplicações ocorreram antes da divisão de répteis, aves e mamíferos. O gene ancestral para IFNs do tipo I perdeu seus introns e sofreu várias duplicações, principalmente após o surgimento de mamíferos placentários. A grande diversificação dos IFNs mostra que estas moléculas foram importantes para o desenvolvimento dos vertebrados, provavelmente devido a sua capacidade de imunomodulação e de regulação de mecanismos fisiológicos (KRAUSE & PESTKA, 2005; HAMMING *et al.*, 2011).

Os IFNs foram as primeiras citocinas conhecidas, sendo que esta designação foi dada por ISAACS & LINDENMANN, em 1957, ao fator liberado no meio quando células eram infectadas por vírus. Esses fatores ao interagirem com outras células eram capazes de induzir resistência a infecção viral. Atualmente sabe-se que os IFNs apresentam outras atividades biológicas além da antiviral. Estas citocinas constituem uma família heterogênea que possuem também atividade antiproliferativa e importante ação na modulação do sistema imune, agindo na resposta inata e na adaptativa (BONJARDIM, 2005).

A produção de IFNs tanto *in vivo* quanto *in vitro* é transitória e requer estímulo por vírus, produtos microbianos ou indutores químicos. Durante a descoberta dos IFNs o *Influenza virus*, vivo ou inativado por calor, foi identificado como um indutor. Posteriormente outros produtos microbianos, incluindo de bactérias, protozoários, e vírus com genoma constituído de ácido ribonucléico (RNA) e de ácido desoxirribonucléico (DNA), também foram reconhecidos como indutores de IFN. Isso demonstrou que ácidos nucléicos microbianos, lipídeos, lipopolissacarídeos (LPS) ou proteínas podem induzir IFNs através da ativação

de receptores que reconhecem padrões moleculares (PRRs), dentre estes os principais são os receptores do tipo toll (TLRs) (FIGURA 1). A transcrição dos genes de IFNs é induzida pela ligação de fatores de transcrição ativados por TLRs em seus promotores. Os mais importantes fatores de transcrição para indução de IFNs são os IRFs, porem existem outros fatores de transcrição que podem induzir a transcrição de IFNs (FIGURA 2) (BORDEN *et al.*, 2007)

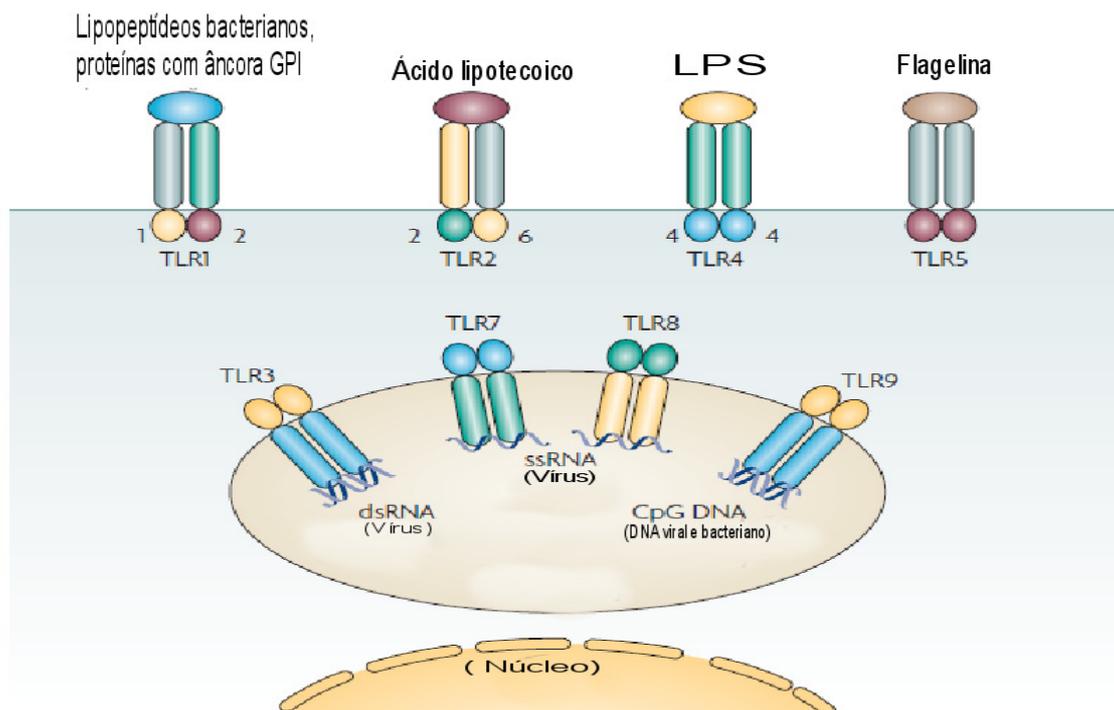


Figura 1: Representação esquemática dos TLRs e seus ligantes

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizados na superfície das células. Seus domínios extracelulares ligam-se a produtos microbianos específicos que atuam como ligantes e os domínios intracelulares iniciam a sinalização através de uma via citoplasmática específica. Vários TLRs, tais como TLR3, TLR7 / 8 e TLR9, reconhecem ácidos nucleicos que muitas vezes são produzidos durante infecções virais. Eles estão ligados na membrana endossomal com domínios de ligação dentro da luz e os domínios de sinalização no citoplasma. Eles também reconhecem RNA dupla fita (ds) e de fita simples (ss) ou DNA ds contendo seqüências CpG.

Fonte: ; BORDEN *et al.*, 2007- Adaptado

Após a secreção dos IFNs no meio, estas citocinas se ligam nos seus receptores de forma paracrina e autocrina. Suas ações são mediadas pelos produtos dos genes estimulados por IFNs (ISGs) (FIGURA 2) (KONTSEK *et al.*, 2003 ; SEN, 2001; BONJARDIM, 2005; BORDEN *et al.*, 2007). A transcrição dos ISGs é regulada através de uma cascata de transdução de sinal desencadeada após a ligação dos IFNs em seus receptores celulares. De um modo geral, a ativação dos ISGs ocorre quando o IFN se liga ao seu receptor celular, que ativa Janus quinases (Jaks) ou tirosinas quinases (Tyks). As quinases ativadas fosforilam transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs), que vão para o núcleo e se ligam a seqüências específicas de DNA presentes nos promotores dos ISGs (FIGURA 2). A interação das STATs e de outros fatores de transcrição com o DNA, com a maquinaria transcricional e com outros coativadores influencia na regulação da transcrição dos ISGs (SEN, 2001 ; UZÉ *et al.*, 2007).

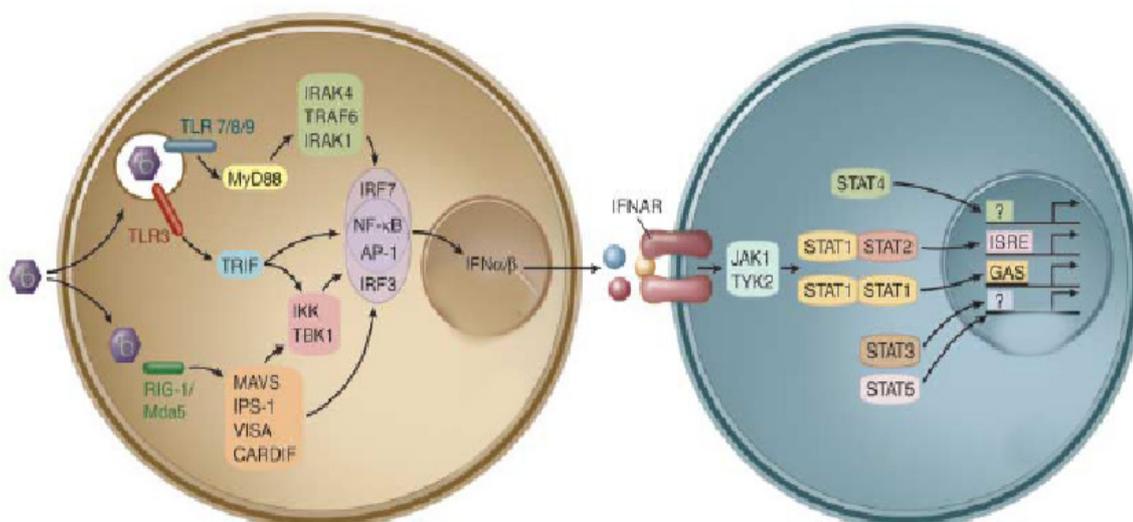


Figura 2: Representação esquemática da indução de IFNs por vírus e da atividade de IFNs.

O reconhecimento de padrões moleculares virais por PRRs celulares (TLRs 3,7,8,9 ou RIG1) ativam cascatas de transdução de sinais que culminam na transcrição de genes de IFNs (esquerda). Os IFNs produzidos após estímulo se ligam em seus receptores celulares e ativam cascatas de transdução de sinais que regulam a transcrição de ISGs

.Fonte: García-Sastre & Biron, 2006-Modificado

Os ISGs são um grupo diverso de mais de 300 genes que medeiam os efeitos biológicos e terapêuticos da estimulação por IFNs (TABELA 1). Os estudos dos mecanismos de ação dessas proteínas resultaram em descobertas fundamentais do controle de transcrição, estabilidade RNA, processamento do RNA e o transporte protéico. O maior conhecimento da ação das ISGs é também importante para a triagem de novas drogas usadas na modulação do sistema IFN (BORDEN *et al.*, 2007).

Alguns ISGs apresentam bem caracterizadas parte das suas atividades biológicas, principalmente os que apresentam atividade antiviral. A proteína quinase R (PKR), o sistema 2'-5' oligoadenilato sintetase/RNase L e a proteína MxA, interferem com a transcrição, a tradução e a replicação do genoma viral ; (LEVY & SATRE *et al.*, 2003; BONJARDIM, 2005). As proteínas 2'5'OAS e PKR, quando ativados por ligação a RNA de dupla fita, interrompem a síntese protéica celular. Já a proteína MxA interfere no processo de montagem e liberação viral, pois inibe formação de vesículas exocíticas e sequestra componentes virais. O gene 6-16 induzido por IFN é também bem caracterizado e está envolvido com a interrupção da síntese protéica e indução da apoptose (SEN, 2001).

Dentre os ISGs, existem citocinas responsáveis pela regulação negativa do sistema IFN, estes ISGs são chamados de supressores da sinalização de citocinas (SOCS) e também são induzidos após a ligação dos IFNs nos receptores. SOCS regulam negativamente a resposta biológica dos IFNs através de inibição de indução de TLRs, inibição de receptores de citocinas induzidos por TLRs e também por desfosforilação de STATs (BONJARDIM, 2009).

TABELA 1: Exemplos de ISGs responsáveis pela ação antiviral e antitumoral na indução por IFNs.

Gene	Função da proteína	Mecanismo de ação
OAS, RNASEL	Clivagem do RNA	Degradação de RNA viral e celular, indução IFN- α/β
PKR	Fosforilação de EIF2 α	Bloqueio da síntese protéica e sinalização transcricional
P56	Ligação a EIF3	Bloqueio da síntese protéica
MX1	Envolve o nucleocapsídeo viral	Interfere com o tráfego intracelular
PLSCR1	Migração de fosfolípidos, ligação ao DNA	Aumenta o nível de mRNA de alguns ISGs
TRAIL/APO2L	Ligante de receptor de apoptose	Apoptose
XAF1	Bloqueio da inibição de apoptose	Apoptose
G1P3 (6–16)	Inibidor de caspase 3	Anti-apoptose
ISG12	Não conhecido	Antiviral
GBP1	GTPase	Antiviral, inibição de angiogênese
ISG20	3`exonuclease para DNA e RNA	Antiviral
PML	Não conhecido	Antiviral, antitumoral
ADAR1	Adenosina deaminase para RNA ds	Processamento do RNA, alteração da tradução
Viperin (cig5)	Não conhecido	Antiviral
iNOS	Oxido nítrico sintetase	Antiviral
Nup98/Nup96	Nucleoporina	Antiviral
IRF7, STAT1	Sinalização para genes de IFNs	Indução de IFN tipo I

ADAR1, adenosina deaminase RNA específica; dsRNA, RNA dupla fita ; EIF2 $\alpha/3$, Fator de iniciação de eucarioto 2 $\alpha/3$; *G1P3*, proteína α induzida por IFN ; *GPB1*, proteína de ligação de guanilato 1, induzível por IFN, 67kDa; *iNOS*, oxido nítrico sintetase induzível; *IRF-7*, fator regulatório de IFN 7; ISGs, genes estimulados por IFN; *Mx1*, resistência a myxovirus 1 (influenza virus) ; *Nup98/Nup96*, nucleoporina 98/96 kDa; *OAS*, 2'-5'-oligoadenilate sintetase; *PKR*, proteína quinase dependente de RNA dupla fita; *PLSCR1*, fosfolípide escramblase 1; *PML*, leucemia promielocítica; *RNASEL*, ribonuclease L; *STAT1*, transdutor de sinal e ativador transcricional 1, 91 kDa; *TRAIL/APO2L*, fator de necrose tumoral relacionado a apoptose induzida por ligantes; *XAF1*, ligante x inibidor da apoptose associada ao fator 1; XIAP, ligante x proteína inibidora da apoptose.

Fonte: BORDEN *et al.*, 2007- Adaptado

As propriedades físico-químicas dos IFNs, as semelhanças entre as estruturas de seus genes e proteínas e suas atividades biológicas possibilitaram dividi-los em três grandes grupos chamados de IFNs do tipo I (IFN α , β , Ω , ϵ , κ , δ e τ), IFNs do tipo II (interferon γ) e IFNs do tipo III (IFN λ 1, λ 2 e λ 3 ou interleucinas (IL) 29, IL 28A e IL28B) (TABELA II) (KONTSEK *et al*, 2003) (SHEPPARD *et al*, 2003).

Devido as diversas atividades biológicas exercidas pelos IFNs, estas citocinas tornaram-se medicamentos para o tratamento de algumas doenças. Os IFNs do tipo I atualmente são utilizados como terapia em infecções causadas pelo

vírus da hepatite C (HCV), assim como no tratamento de neoplasias malignas e esclerose múltipla (SADLER *et al.*, 2008). IFN tipo II, γ -1b, é usado para tratamento de doença granulomatosa crônica.

1.1.1 INTERFERONS TIPO I

Todos os membros desta superfamília atuam na forma de monômeros e apresentam uma estrutura terciária semelhante composta por cinco alfa hélices (RADHAKRISHNAN *et al.*, 1996). Os membros mais representativos desta superfamília são os IFNs α , β , Ω , ϵ , κ , δ e τ . Estes IFNs apresentam entre 75-90 % de identidade de aminoácidos(aa), entre si, e sua presença varia em relação às diversas espécies de vertebrados. Todos os IFNs do tipo I se ligam ao receptor de IFN tipo I (IFNAR). Este receptor é composto de duas cadeias denominadas de cadeia 1 do receptor de IFN tipo I (IFNAR1) e cadeia 2 do receptor de IFN tipo I (IFNAR2), que estão associadas a duas quinases intracelulares latentes denominadas de TyK2 e JAK1, respectivamente (FIGURA 3) (STARK *et al.*, 1998; BONJARDIM, 2005).

A subunidade IFNAR1 possui uma região citoplasmática de aproximadamente 100 resíduos de aa e é responsável pela alta espécie-especificidade do receptor. Já subunidade IFNAR2 humana apresenta três formas, uma forma longa (huIFNAR2c), uma forma curta (huIFNAR2b) e uma forma solúvel (huIFNAR2a), sendo apenas a forma longa capaz de transduzir os sinais desencadeados pelos IFNs (HAN *et al.*, 2001). Apesar dos IFNs deste grupo compartilharem o mesmo receptor eles apresentam diferenças na afinidade pelo receptor, uma comparação entre o IFNs α 2 e β mostrou que o IFN β é mais ávido pelo receptor, o que lhe fornece uma maior potencia em sua atividade biológica (MARIJANOVIC *et al.*, 2007)

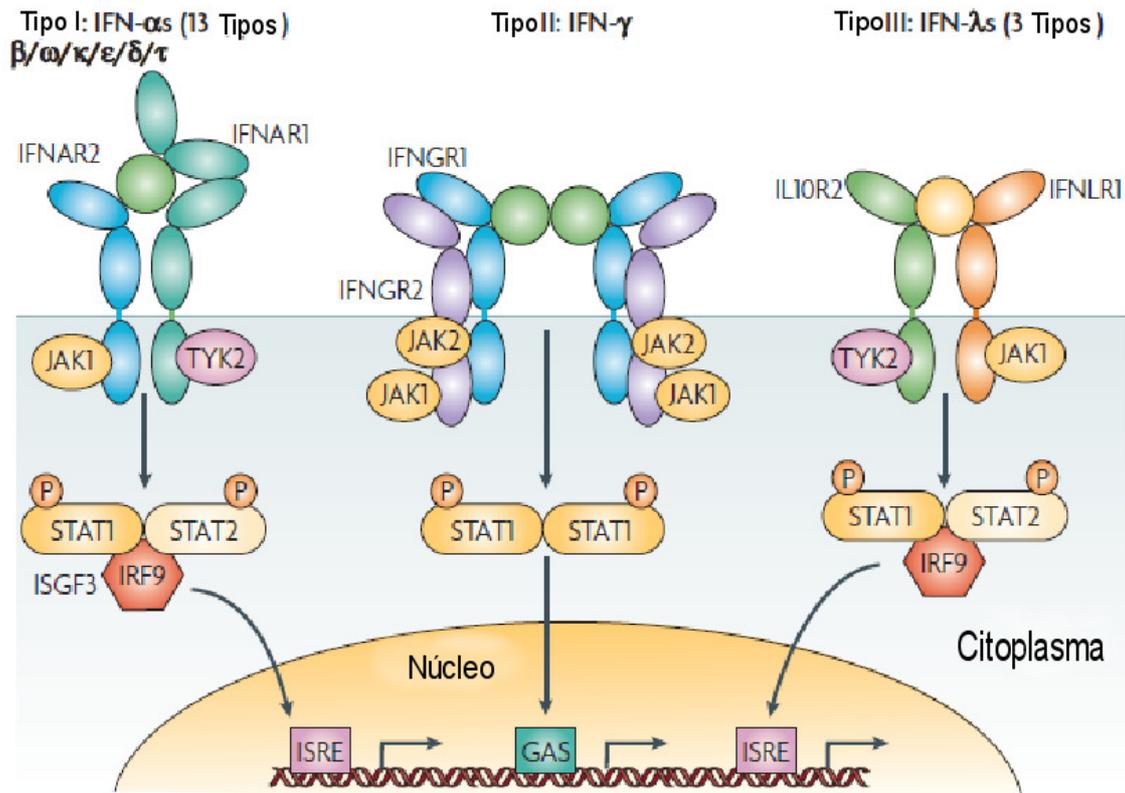


FIGURA 3: Representação esquemática das vias de sinalização por IFNs.

IFNs do tipo I, II e III são mostrados se ligando em seus respectivos receptores e ativando fatores de transcrição que se dirigem ao núcleo e regulam a transcrição de ISGs.

Fonte: Borden *et al.*, 2007-Adaptado

Após a ligação dos IFNs tipo I ao seu receptor, ocorre a fosforilação cruzada e a conseqüente ativação de TyK2 e JAK1. Estas são responsáveis pela fosforilação seqüencial de IFNAR1, STAT1 e STAT2. Após os eventos de fosforilação, e formação do heterodímero STAT1/STAT2, esse se dissocia do receptor podendo se associar com o fator de transcrição p48 formando o fator de transcrição estimulado por IFN 3 (ISGF3). Este fator de transcrição é responsável pela expressão da maioria dos genes estimulados por IFN via ligação ao elemento regulatório de genes estimulados por IFNs (ISRE) no DNA (STARK *et al.*, 1998; LEVY & SATRE, 2001). Além do fator de transcrição ISGF3, outros fatores regulatórios de IFNs tais como IRF-1, IRF-2, IRF-3 e IRF-7 estão relacionados à indução transcricional dos ISGs e também dos próprios

IFNs (TANIGUCHI & TAKAOKA, 2002; SATO *et al.*, 2001; KONTSEK, *et al.*, 2003; HONDA *et al.*, 2005).

1.1.2 INTERFERONS TIPO II

A superfamília de IFNs do tipo II é representada por um único membro denominado de IFN γ . Este IFN é produzido por células Natural Killer (NK), linfócitos T, macrófagos e células dendríticas após contato com diversos estímulos imunológicos ou inflamatórios, tais como infecções, IL e mitógenos. O gene que codifica para o IFN γ está presente no cromossomo humano 12 (KONTSEK, *et al.*, 2003; STARK, *et al.*, 1998).

Assim como os IFNs do tipo I, o IFN γ exerce atividade antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. Esta última é feita principalmente através da ativação de macrófagos, regulação da produção de fator de necrose tumoral (TNF), regulação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, expressão de receptores de IL-12 em linfócitos T CD4 e bloqueio da produção de IL-4 (PESTKA *et al.*, 2004).

O receptor de IFN tipo II (IFNGR) é composto por duas cadeias, denominadas de cadeia 1 do receptor de IFN tipo II (IFNGR1) e de cadeia 2 do receptor de IFN tipo II (IFNGR2), atuando na forma de tetrâmero. A cadeia IFNGR1 é essencial para a ligação do IFN γ , enquanto a cadeia IFNGR2 é importante para que a transdução de sinal ocorra. (KONTSEK *et al.*, 2003 ; MARSTERS *et al.*, 1995). Assim como constatado para os IFNs do tipo I, IFNGR1 se associa a JAK 1 e IFNGR2 a JAK 2. Logo após a ligação do IFN γ nas cadeias de IFNGR1, ocorre a formação de sítios de ligação para as duas cadeias IFNGR2. Com este evento ocorre uma aproximação dos domínios citoplasmáticos de cada receptor, com a conseqüente autofosforilação e transfosforilação das JAKs. As STATs serão então fosforiladas e irão então se dissociar do

complexo, formar um homodímero e translocar para o núcleo. Este fator de transcrição irá se ligar a seqüências ativadas por IFN γ (GAS) (FIGURA 3).

1.1.3 INTERFERONS TIPO III

O subgrupo dos IFNs λ foi encontrado em 2003, e é composto em humanos por três IFNs ($\lambda 1$, $\lambda 2$ e $\lambda 3$) que possuem uma similaridade de 17% com os IFNs do tipo I. Estes IFNs se ligam aos receptores de IFN tipo III (IFNLR), composto de duas cadeias denominadas de cadeia 1 do receptor de IFN λ (IFNLR1) e receptor de interleucina 10 2 (IL-10R2) (FIGURA 2). A cadeia IFNLR1 do receptor não é encontrada em vários tipos celulares transformados ou não, o que torna as atividades biológicas destes IFNs bastante restritas. Os IFNs λ são capazes de inibir a multiplicação viral, regular a expressão de MHC de classe I e induzir fatores de transcrição semelhantes aos induzidos por IFNs do tipo I (KONTSEK, *et al.*, 2003 ; KOTENKO, *et al.*, 2003).

Assim como grande parte dos IFNs do tipo I, os IFNs λ são induzidos após infecções por diversas famílias de vírus e após estímulo de TLRs por agonistas. Sua cinética de indução por células dendríticas após estímulo por LPS ou poli I:C se assemelha à cinética de indução do IFN β , uma vez que os IFNs λ são induzidos antes da maior parte dos IFNs α . A indução dos genes de IFNs λ ocorre de forma diferencial, com a indução de IFN $\lambda 1$ sendo regulada por IRF-3 e IRF-7 e a indução dos IFNs $\lambda 2$ e 3 sendo reguladas apenas por IRF-7 (COCCIA *et al.*, 2004 ; YANG *et al.*, 2005 ; MATIKAINEN *et al.*, 2006; OSTERLUND *et al.*, 2007).

Assim como os IFNs do tipo I, os IFNs do tipo III também apresentam atividade antiproliferativa em células transformadas derivadas de tumores humanos ou murinos capazes de responderem a eles (DUMOUTIER *et al.*, 2004 ; ZITZMANN *et al.*, 2006). Apesar de se ligarem a receptores celulares distintos, as vias de sinalização desencadeadas por IFNs do tipo III até então conhecidas são idênticas às vias de sinalização de IFNs do tipo I. O controle destas vias de

sinalização também ocorre de forma similar, através da regulação mediada por supressores de sinalização de citocinas (SOCS) (BRAND *et al*, 2005b ; ZITZMANN *et al*, 2006).

A atividade antiviral *in vitro* de IFNs do tipo III contra vários vírus humanos ou murinos já foi demonstrada. Por exemplo podemos citar *Encephalomyocarditis virus*, *Sinbis virus* (KOTENKO *et al*, 2003 ; SHEPPARD *et al*, 2003), *Hepatitis B virus* e *Hepatitis C virus* (ROBEK *et al*, 2005), *Human herpesvirus 5 (CMV)* (BRAND *et al*, 2005) , *Human herpesvirus 2* (ANK *et al.*, 2006), *Apeu virus* (ALMEIDA *et al.*, 2008), *Human immunodeficiency virus 1* (HOU *et al.*, 2009), *West Nile virus* (MA *et al.*, 2009), *Sin Nombre vírus*, *Andes virus* ,(PRESCOTT *et al.*, 2010). No caso do *Human herpesvirus 2*, a atividade antiviral de IFN λ também foi mostrada *in vivo* (ANK *et al.*, 2006). *Vaccinia virus* WR recombinantes que codificam IFN λ 2 murino são atenuados quando comparados com vírus selvagens em infecções de camundongos BALB/C (BARTLETT *et al.*, 2005). Recentemente, um viroceptor codificado por um vírus do gênero *Yatapoxvirus* capaz de se ligar a IFNs λ foi descrito (HUANG *et al.*, 2007). A capacidade de IFNs λ em induzir estado antiviral contra um grande número de vírus, e a existência de um mecanismo de evasão contra estes IFNs são evidências de sua importância no controle de infecções virais (BONJARDIM, 2005).

A atividade antiviral e antiproliferativa dos IFNs do tipo III ocorrem de forma menos intensa e em um número restrito de tipos celulares, quando comparadas com as atividades dos IFNs do tipo I. A atividade mais restrita destes IFNs pode ser atribuída a menor quantidade de tipos celulares que codificam a cadeia IFNLR1 de seu receptor (MEAGER *et al.*, 2005) (GALLAGHER *et al.*, 2010; JEWELL *et al.*, 2010).

Os IFNs do tipo III também possuem atividade imunomodulatória, e é neste tipo de atividade que eles até então se diferem dos IFNs do tipo I. Tratamento de células dendríticas imaturas com IFN λ 1 resulta em um processo de maturação distinto, resultando em células dendríticas maduras com altos níveis de MHC

de classe 1 e 2 capazes de migrar e que retêm a capacidade fagocitária (MENNECHET & UZÉ, 2006). PBMCs tratados com IFN λ 1 produzem IL6, IL8 e IL10, mas não TNF ou IL1. Destas células, as que respondem melhor ao tratamento são monócitos e macrófagos (JORDAN *et al.*, 2007a). IFNs do tipo III também são capazes de modular a resposta imune, principalmente através da diminuição de níveis de IL13 (JORDAN *et al.*, 2007b).

1.2 AUTOIMUNIDADE E INTERFERONS

Os IFNs são citocinas de extrema importância na regulação fina da resposta imune, tanto contra doenças infecciosas e tumores, quanto na manutenção do equilíbrio do sistema imune em estado fisiológico. Uma falta de equilíbrio no sistema IFN tem uma importância central no aparecimento e persistência de doenças autoimunes (THEOFILOPOULOS *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2008).

As primeiras evidências de que os IFNs estavam envolvidos na patogênese de doenças autoimunes vieram de estudos com lupus eritematoso sistêmico, e subsequentemente foi encontrado a participação dos IFNs em outras doenças do sistema imunológico, como SSc e algumas formas de artrite reumatóide (MEYER, 2009).

O mecanismo da patogênese de autoimunidades tem muitas vezes os IFNs com um papel central no início e manutenção das doenças. A ligação de IFN α/β e IFN λ em seus receptores celulares aumentam a expressão de ISGs, incluindo o MHC classe I e classe II. Em condições normais, moléculas de MHC classe I são expressas em vários tipos celulares e as moléculas de MHC classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos, tais como células B, macrófagos e células dendríticas. No entanto em condições patológicas é observado a expressão aberrante de moléculas de MHC classe II em células que não fazem parte do sistema imune, este fato tem sido correlacionado com muitas doenças autoimunes, como por exemplo doenças autoimunes da tireóide, diabetes tipo I, artrite reumatóide e esclerose múltipla.

Assim esta expressão aumentada de moléculas de MHC classe II em células alvo de autoimunidade tem sido relacionado a ação dos IFNs sobre essas células (COELHO *et al.*, 2008).

Existe um modelo consensual onde a produção de IFNs em doenças autoimunes ocorre por ativação de TLRs presentes na membrana celular ou em compartimentos endossomais de células dendríticas por ligantes exógenos (LPS, DNA com sequências CpG sem metilação, ssRNA e dsRNA e/ou ligantes exógenos (células em apoptose, tecidos necrosados e nucleoproteínas) (Borden *et al.*, 2007). Quando os TLRs são ativados eles ativam diferentes moléculas adaptadoras (MyD88, Tirap, Trif e Tram) que amplificam a transdução do sinal sobre as células dendríticas. As moléculas adaptadoras ativam outras moléculas no interior das células, incluindo proteínas quinases, que amplificam o sinal e levam a indução ou supressão de genes que orquestram a resposta inflamatória (BEUTLER *et al.*, 2006). O recrutamento e ativação de IRF-3 ativa a transcrição de IFN β , que após ser secretado se liga ao receptor de IFN, ativando a via JAK-STAT e levando subsequentemente a expressão de IRF-7, que leva a expressão de outros IFNs (FIGURA 4).

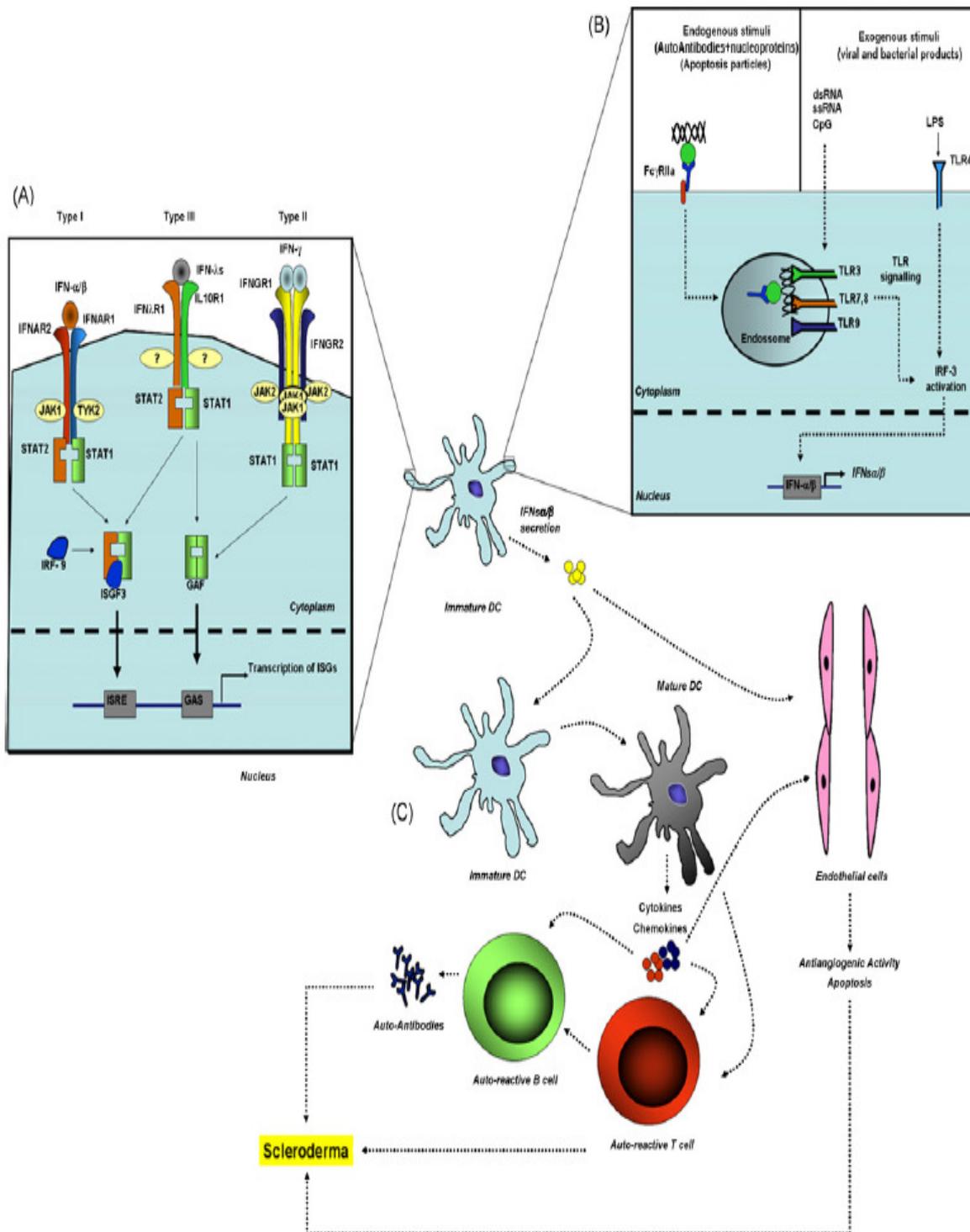


FIGURA 4: Representação esquemática da provável via pela qual uma doença autoimune (Esclerodermia) pode surgir e se perpetuar.

(A) IFNs tipo I (α/β), IFN tipo II (γ) e IFN tipo III (IFNs λ) se ligam aos seus respectivos complexo de receptores. Todos ativam a via de JAK-STAT levando a indução gênica de ISGF3 ou GAF/AAF. Quando fosforilados, esses fatores de transcrição ligam-se nos promotores de

ISGs chamados ISRE. (B) Estímulos endógenos (produtos bacterianos ou virais) irão sensibilizar as células dendríticas via TLR4 (LPS) sobre a membrana celular ou TLR3 (dsRNA), TLR7 e TLR 8 (ssRNA) ou TLR 9 (seqüências CpG de DNA) nos endossomos. Estímulos endógenos serão percebidos através da ligação de imunocomplexos, que se formam através de autoanticorpos ligados a nucleoproteínas acopladas ao DNA/RNA, a TLR3, TLR7,TLR8 e TLR9. Após da ativação da transdução de sinal pelos TLRs, IRF-3 e inicia a produção de IFN α/β e ativação através da sinalização por IFNs de varias células auto imunes reativas. (C) Inicialmente, IFNs produzidos por células dendríticas são conseqüência da infecções virai ou bacterianas. Os IFNs produzidos promovem a maturação das células dendríticas, ativação de linfócitos T e produção de autoanticorpos por linfócitos B. Proteínas associadas ao DNA ou RNA, geradas através de apoptose e necrose celular se ligam a autoanticorpos formando assim complexos imunes que podem agir como indutores endógenos que causam prolongamento da produção de IFNs. Isso estimula a resposta autoimune com conseqüente produção de mais autoanticorpos e formação de mais complexos imunes.

FONTE: COELHO *et al.*, 2008

As células dendríticas são células importantes para iniciar e modular a resposta imune induzida pelo reconhecimento dos agentes infecciosos. Após a estimulação dos TLRs por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) um complexo programa de maturação é desencadeado o que resulta em migração de células dendríticas dos tecidos para os linfonodos, que reforçam a estimulação do linfócitos B. Durante o processo de maturação as células dendríticas produzem varias citocinas e quimiocinas que agem sequencialmente em diferentes microambientes e sobre diferentes populações leucocitárias para estabelecer uma inflamação e uma resposta imune inata e assim recrutar monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos para o sitio inflamatório (COELHO *et al.*, 2008).

O IFNs produzidos após a estimulação de TLRs em doenças autoimunes podem auxiliar na diferenciação e ativação de células dendríticas imaturas em células dendríticas em processo de maturação, que são responsáveis por ativar células T e, finalmente, a produção de autoanticorpos por células B. Os autoanticorpos produzidos irão se ligar a nucleoproteínas ou partículas que desencadeiam apoptose e as células necróticas desencadeiam uma resposta autoimune. Por conseqüência a secreção de IFNs irá promover a ativação de

células T e B auto reativas através da secreção de citocinas e quimiocinas por células dendríticas, assim o processo autoimune é sustentado (THEOFILOPOULOS *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2008). A participação de IFNs do tipo III ainda não foi estudada nestas doenças.

1.3 ESCLEROSE SISTÊMICA

A SSc é uma doença multifatorial e heterogênea do tecido conjuntivo, os estudos de sua etiologia encontram-se em grande ascensão, porém sua exata natureza e os fatores que delineiam as suas causas são desconhecidos (ABRAHAM & DISTLER, 2007). A epidemiologia desta doença não é bem estabelecida, porém os estudos realizados na população norte americana, estimam que a SSc prevalece em 240 adultos por milhão e incide em 19 novos adultos por milhão por ano (MAYES, 2003).

Em geral, a taxa de sobrevivência situa-se entre 34 e 73%. É, no entanto, mais curta em homens e pacientes mais velhos do que em mulheres e pacientes mais jovens. A mortalidade média anual foi relatada ser entre 0,9 e 3,8 por milhão de habitantes por ano, e na Austrália foi de 4,1. Há um risco 4,6 vezes maior de morte em comparação com a população geral. A maioria dos pacientes morrem de doença cardiopulmonar ou renal. Há também um aumento da mortalidade por câncer, particularmente do pulmão (MAYES, 2003).

A SSc apresenta-se como uma doença sistêmica que afeta a pele e também órgãos internos, principalmente pulmões, trato gastrointestinal, coração e rins. As principais características dessa doença são fibrose cutânea e visceral progressiva com alterações microvasculares proeminentes e presença de anormalidades imunes celulares e humorais. A SSc (FIGURA 5) compreende a SSc difusa e a SSc limitada, são características comuns a todas as formas da doença o dano tecidual e a presença de autoanticorpos. A forma difusa da doença apresenta rápida progressão, dano grave aos órgãos internos, dano

grave na pele, sua evolução é usualmente progressiva e incurável. A forma limitada é caracterizada por apresentar progressão mais lenta, a pele é o órgão mais afetado, os danos aos órgãos internos são menos grave. Os indivíduos com SSc limitada podem desenvolver a síndrome de CREST, que é caracterizada pelo aparecimento dos seguintes sinais: calcinose cutânea, fenômeno de Raynaud, disfunção esofágica, esclerodactilia e telangiectasia (FIGURA 6) (STEEN & MEDSGER, 1990; SONTHEIMER, 2004; DENTON &



BLACK, 2004).

FIGURA 5: Lesões e características da SSc. (A) Face esclerótica . (B) Lesão no tecido bucal (C) Lesão inicial na ponta dos dedos (D) Necrose na ponta dos dedos.

Fonte: www.dermis.net



FIGURA 6: Danos que compõem a síndrome CREST : (A) Calcinose cutânea. (B) Telangiectasia. (C) Esclerodactilia. (D) Fenômeno de Raynaud.

Fonte: www.dermis.net

A doença tem início com alterações em células do endotélio e inflamação, que resulta no recrutamento de linfócitos e em dano tecidual. A fibrose característica da doença é resultado de reparo tecidual excessivo, provavelmente mediado por células mesenquimais alteradas (ABRAHAM e VARGA, 2005)

Embora as causas que levam ao aparecimento da SSc sejam ainda desconhecidas, acredita-se que a doença tenha uma grande influência da interação entre fatores genéticos dos hospedeiros e fatores ambientais. Vários fatores tem sido propostos como agentes que podem causar a doença, estes fatores incluem exposição a solventes orgânicos, toxinas, tratamento com IFN, estresse oxidativo associados a geração de radicais livres, agentes infecciosos, tal como o *Human herpesvirus 5 (CMV)* (MAITRE *et al.*, 2004).

A SSc não é herdada de forma mendeliana, porém algumas características genéticas tem papel importante na susceptibilidade e na progressão da doença. Tem sido identificado alguns polimorfismos específicos associados a SSc. Dentre os genes que apresentam estes polimorfismos estão os que codificam fatores de regulação vasomotora, marcadores de células B, quimiocinas, receptores de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento teciduais e fatores de transcrição. Estudos recentes relacionaram um polimorfismo no gene que codifica o fator regulatório de interferon 5 (IRF-5) com a susceptibilidade ao desenvolvimento de lupus eritematoso e SSc. Esta mutação também está associada a desenvolvimento de fibrose pulmonar em pacientes com SSc (DIEUDE *et al.* 2009)

A influência dos fatores genéticos e ambientais no aparecimento da doença e em sua manutenção são apenas uma das faces que envolvem a etiopatologia da SSc. A expressão alterada de citocinas e quimiocinas e a produção de autoanticorpos tem sido encontradas em pacientes com SSc. Além disso tem

sido estabelecido que a maioria das células imunes com fenótipo Th2 de pessoas doentes secretam uma grande quantidade de interleucinas 4, 5 e 10 (JIMENEZ & DERK, 2004).

Estudo pioneiro no Brasil, no Laboratório de Vírus, envolvendo um grupo transdisciplinar realizou análise da expressão gênica em células de lesão de pele de pacientes com SSc e descreveu efeitos modulatórios do IFN β humano recombinante em células de pacientes com SSc (OLIVEIRA 1999).

Outros estudos também tem demonstrado o papel dos IFNs sobre a etiologia e a patogênese da SSc. O aumento na produção de IFN γ e de expressão de ISGs em PBMCs de pacientes com SSc (MOLTENI *et al.*, 1999; VALENTINI *et al.*, 2001) e o aumento no nível de mRNA de duas ISGs clássicas, proteína quinase dependente de RNA dupla fita (PKR) e 2'5'oligoadenilatossintetase (2'5'OAS), em fibroblastos de pacientes, foi descrito (COELHO *et al.*, 2007). Fibroblastos de pessoas com SSc apresentam altos níveis de mRNA do gene do IFN β , induzidos com vírus (OLIVEIRA 1999). Pequenos títulos de IFN α foram detectados no soro de pacientes com SSc, assim como já descrito anteriormente para lúpus eritematoso (ELORANTA *et al.*, 2010).

SSc é uma doença que assim como outras autoimunidades apresentam desregulação de componentes do sistema imune. Os IFNs são citocinas de grande importância na regulação imune e como descrito já existem várias evidências da participação dos IFNs na desregulação imune presente nas autoimunidades.

II. JUSTIFICATIVA

SSc é uma doença do tecido conjuntivo que afeta a pele e órgãos internos e ainda é incurável. Segundo estudos na população dos Estados Unidos da América e da Europa esta doença atinge 240 adultos por milhão e são relatados 19 novos casos por ano por milhão de adultos. Existe uma variação muito grande em termos de prognóstico. Para alguns pacientes representa uma doença mais branda, enquanto para outros é uma doença grave e letal, sendo para a maioria uma doença que afeta o modo como elas vivem o seu dia a dia. A SSc é classificada como uma doença autoimune, juntamente com a artrite reumatóide, o lúpus eritematoso sistêmico, a síndrome de Sjögren e a esclerose múltipla e esta patologia ainda não apresenta etiologia e tratamento estabelecidos.

Os IFNs são citocinas imunoregulatórias de grande importância na homeostase do sistema imune e na proteção contra infecções. Os vários subtipos de IFNs e suas complexas vias de sinalização sugerem que o funcionamento destas moléculas deve ser regulado de forma bastante complexa. Os IFNs do tipo III se ligam a um receptor celular distinto, mas a maior parte de suas atividades biológicas são redundantes com as atividades biológicas dos IFNs do tipo I. Até o momento nada foi descrito sobre a participação dos IFNs tipo III nas doenças do sistema imunológico e pouco se sabe da participação de IFNs do tipo I na SSc. Como os IFNs do tipo I exercem uma grande influência em doenças autoimunes, torna-se importante estudar a participação dos IFNs do tipo III nas autoimunidades, pois estas citocinas apresentam várias atividades biológicas redundantes.

O Laboratório de Vírus possui uma linha de pesquisa com SSc, onde até então foi analisado a expressão gênica de ISGs em fibroblastos de pacientes, sendo que foram encontrados ISGs que apresentam sua expressão alterada em pacientes. Também foram obtidos dados da expressão gênica de IFN β em fibroblastos, que sugerem uma alteração na expressão desta citocina. Os estudos mais recentes do laboratório demonstraram uma alteração na expressão gênica de MxA em PBMCs de um pequeno grupo de pacientes, mas não de 2'5'OAS como verificado em fibroblastos, isto sugere uma

diferença na resposta a IFN nos diferentes modelos. O uso de PBMCs neste estudo se justifica pelo fato destas células estarem ligadas a resposta imune e também porque alguns tipos celulares são produtores de IFNs. O estudo em PBMCs retrata o que acontece de forma sistêmica nas autoimunidades.

Os níveis basais de expressão de genes ligados ao sistema IFN em PBMCs “frescos”, possibilita aprofundar resultados anteriores da participação dos IFNs na SSc. Mais esclarecimento sobre a participação de genes ligados ao sistema IFN na SSc torna-se importante para contribuir no entendimento da etiologia e patogênese desta doença.

Estudos sobre SSc na população brasileira são extremamente raros, desta forma este trabalho contribui para o entendimento da participação de IFNs nesta população em específico.

III. OBJETIVOS

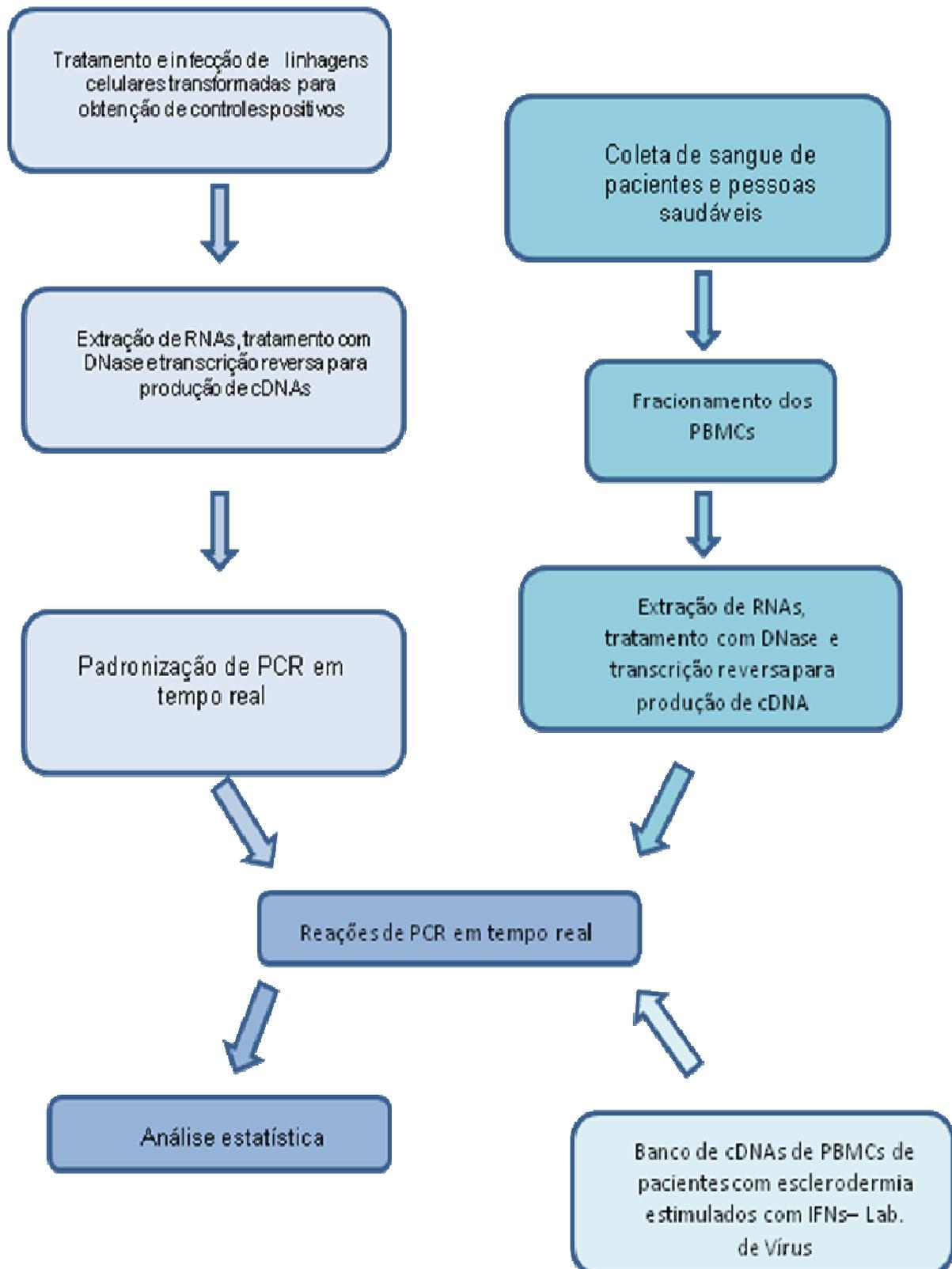
3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a existência de alterações no nível de mRNA de componentes do sistema IFN em PBMCs de pacientes com SSc.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar uma reação de real time PCR para os genes que terão sua expressão analisada neste projeto (IRF-7, 6-16, MxA, 2'5'OAS, IFN- α 2, IFN- β , IFN λ 1 e IFN- λ 2/3).
- Comparar os níveis de expressão de IRF-7(regulador de IFN) em PBMCs dos pacientes com SSc em relação a expressão em PBMCs de pessoas saudáveis.
- Analisar o nível de mRNA de ISGs (6-16, MxA e 2'5'OAS).
- Analisar o nível de mRNA de IFNs (IFN- α 2, IFN- β , IFN λ 1 e IFN- λ 2/3).
- Analisar o nível de mRNA de IFN- β e IFN- λ 1 em PBMCs de pacientes estimulados com IFN- β humano e com IFN λ 1 humano.

IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



V. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CÉLULAS

5.1.1 A549

As células A549 são células derivadas de carcinoma de pulmão humano. Apesar de serem células tumorais, elas respondem ao tratamento com os IFNs e são permissivas a infecção com VSV. Estas células foram utilizadas nos experimento de indução da expressão de IFNs após infecção com VSV e no experimento de indução da expressão dos ISGs após tratamento com IFN α .

As células A549 foram cultivadas em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, Brasil), gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina potássica (100 U/mL) e fungizona (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As células foram mantidas em garrafas apropriadas e incubadas em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C.

5.1.2 VERO

As células da linhagem contínua Vero, derivadas de epitélio de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), foram adquiridas originalmente da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA, na passagem número 126. Essas foram cultivadas no Laboratório de Vírus da UFMG por um número desconhecido de passagens. Essas células foram utilizadas para multiplicação de vírus, titulação de vírus, titulação de IFNs e atividade antiviral dos IFNs dos tipos I e III. Células Vero foram utilizadas nos ensaios de titulação dos soros, pois a uma deleção cromossômica nas seqüências gênicas que expressam IFNs do tipo I (PETRILLO-PEIXOTO *et al*, 1980; DIAZ *et al*, 1988) e, por isso, não são capazes de produzir essas citocinas frente a estímulos.

As células Vero foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, Brasil),

gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (100 U/mL) e fungizona (2 µg/mL). As células foram mantidas em garrafas apropriadas e incubadas em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C.

5.1.3 PBMCs

Os PBMCs foram obtidos a partir do sangue de pessoas saudáveis e de pacientes com SSc sistêmica, após assinatura do termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética da UFMG (COEP – UFMG). A triagem dos pacientes foi feita pelos médicos Antônio Carlos Martins Guedes e Flávia Patrícia Sena Teixeira Santos, do Hospital das Clínicas da UFMG. O sangue foi coletado por pessoal treinado e as células foram fracionadas.

Tabela 2 – Informações sobre os indivíduos que consentiram participar da pesquisa.

	Sexo	Idade (anos)	Tempo do diagnóstico (anos)
P1	F	30	1
P2	F	54	5
P3	M	35	5
P4	M	29	1
P5	M	40	7
P6	F	30	2
P8	M	56	6
P9	F	58	11
P10	F	70	20
C1	M	39	-
C2	F	32	-
C3	M	25	-
C4	F	24	-

5.2 VÍRUS

5.2.1 VSV

A amostra de *Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSV) utilizada é proveniente do Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG e corresponde à amostra ATCC VR-1238 (Indiana Lab [V-520-001-522]).

5.2.2 EMCV

A amostra do *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) foi cedido pelo Dr. Ian Kerr, Londres, Reino Unido. Os estoques de vírus foram obtidos em cultivos de fibroblastos de camundongos (L-929).

5.3 INTERFERON α

Os IFN α 2a (Roferon Roche) recombinante foi obtido comercialmente, aliquotados e armazenados a -70°C até o momento do uso.

5.4 EXTRAÇÃO DE RNA CELULAR

A extração RNA total foi feita com o kit Rneasy (Qiagen®) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram raspadas e lisadas com 350 μl de RLT. Após homogeneização, foram acrescentados 350 μl de etanol 70% e as amostras foram passadas pela coluna de afinidade (Sílica). Sequencialmente a coluna foi lavada uma vez com tampão RW1 e duas vezes com tampão RPE. O RNA foi eluído da coluna em 40 microlitros de água ultra pura isenta de RNAs.

5.5 TRATAMENTO COM DNASE

Parte do extrato de RNA obtido foi tratado com DNase I (New England, BioLabs) antes da transcrição reversa. Primeiramente, adicionou-se 3 μL do tampão 10X da enzima aos 27 μL da solução de RNA. Foi acrescentado à preparação 1 μL de DNase I (2 U), com posterior incubação à 37°C por 10 min. Após a incubação, as amostras foram colocados em banho de gelo, para a adição de 0,3 μL de EDTA a 0,5 M. Finalmente, foi feita uma incubação à 75°C por 10 min para inativação da enzima DNase I.

5.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a produção de DNA complementar (cDNA), cerca 1 μg de RNA extraído (tratado com DNase), foi incubado a 70°C por 5 min, juntamente com 0.5 μg de oligo dT. Posteriormente a mistura foi incubada em banho de gelo, e os seguintes componentes foram adicionados à reação: 5 μL de tampão de RT-PCR 5X (Tris a 250mM pH 8.9, MgCl_2 a 15mM, KCl a 375mM, DTT a 50mM) e 1,25 de dNTP (10mM), 1 (200U) de enzima M-MLV RT (200U/ μL) (Promega Corporation-EUA) e água ultra pura livre de nuclease q.s.p 25 μL . Essa mistura foi incubada por 60 min a 42°C, me seguida resfriada em banho de gelo. O cDNA resultante foi diluído em 50 μl de água ultra pura livre de nuclease e utilizado como molde nas reações de PCR em tempo real.

5.7 INFECÇÃO COM VSV

500 mil células A549 foram implantadas em uma câmara de 9.6 cm^2 com meio DMEM, após 24h de incubação em atmosfera de 5% CO_2 a 37°C, foram infectadas com VSV (M.O.I. 0.01) durante 18h. Após as 18h de infecção o RNA total foi extraído e 1 μg foi utilizado em reação transcrição reversa, o

cDNA obtido foi utilizado na padronização das reações de PCR em tempo real para os genes dos IFNs β , α , $\lambda 1$ e $\lambda 2/3$.

5.8 TRATAMENTO COM IFN α

500 mil células A549 foram implantadas em uma câmara de 9.6 cm² com meio DMEM, após 24h de incubação em atmosfera de 5% CO₂ a 37°C, foram tratadas com 1000U de IFN $\alpha 2a$ durante 18h. Após as 18h de tratamento o RNA total foi extraído e 1 μ g foi utilizado em reação transcrição reversa, o cDNA obtido foi utilizado na padronização das reações de PCR em tempo real para os ISGs 6-16, MxA e 2'5'OAS.

5.9 FRACIONAMENTO DE PBMCs

PBMCs do sangue de doadores saudáveis ou pacientes com SSc foram fracionados da seguinte forma: 10 ml de sangue serão coletados em tubos contendo EDTA e diluídos no mesmo volume de PBS 1x. O sangue foi adicionado lentamente sobre uma camada de 10 ml de ficoll-Paque®, centrifugado por trinta minutos por 1200 rpm e o anel de PBMCs foi aspirado com uma pipeta. Os PBMCs foram lavados com 20 mL PBS 1X (BOYUM 1968). As células foram contadas em câmara de Neubauer e o RNA celular total foi extraído de 1 milhão de células.

5.10 PBMCS ESTIMULADOS COM IFNS (cDNA)

O laboratório de vírus da UFMG possui um banco de cDNAs de PBMCS de pacientes com SSc e de pessoas saudáveis, ambos estimulados com IFNs humanos recombinantes do tipo I e tipo III. Neste trabalho foram utilizados cDNAs obtidos de PBMCS de pacientes com SSc difusa (TABELA 3) e doadores saudáveis como controle. Os PBMCS foram estimulados com 1000U/mL de IFN β humano recombinante ou com 1000U/mL de IFN λ 1 humano recombinante.

O referido banco de cDNAs foi criado pelo Dr. Gabriel Magno de Freitas Almeida, durante o seu doutorado (ALMEIDA, 2008)

Tabela 3 –Informações sobre os indivíduos que consentiram participar da pesquisa.

	Sexo	Idade (anos)	Tempo do diagnóstico (anos)
P1	F	50	3
P2	M	73	-
P3	F	51	31

5.11 PCR EM TEMPO REAL

Para a realização da PCR em tempo real oligonucleotídeos foram desenhados ou obtidos da literatura, sendo que todos são capazes de reconhecer regiões específicas dos mRNA dos genes alvo e do gene normalizador. As condições de amplificação para os genes do IFNs β , α , λ 1 e λ 2/3 foram padronizadas com a utilização da amostra de cDNA obtido de células A549 infectada com VSV (M.O.I. 0,01) por 18h. As reações para os ISGs 6-16, MxA e 2`5`OAS foram padronizadas com a utilização e amostra de cDNA obtido de células A549 tratadas com 1000Ude IFN α 2a por 18h.

As reações para os genes que tiveram o nível de mRNA mensurado neste projeto, foram realizados com os seguintes reagentes: SYBRGreen® Master Mix Applied Biosystems 1x oligonucleotídeos senso e anti-senso 100nM e 1µl de cDNA. As condições para todas as reações foram as seguintes: 10mim. 95°C e 45 ciclos de 95°C 15seg. 60° 1mim. Após a reação os produtos gerados foram submetidos a uma curva de dissociação, onde foi verificado a especificidade da reação.

Produtos da PCR gerados nas padronizações foram utilizados para a construção de curvas padrão, as quais foram utilizadas nos PCRs em tempo real para possibilitar a análise da expressão gênica pelo método da curva padrão relativa.

A reações foram feitas no termociclador *StepOne*® da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*® versão 2.2 da Applied Biosystems.

5.12 OLIGONUCLEOTÍDEOS

Os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados nas reações de PCR em tempo real e de PCR (TABELA 4).

TABELA 4: Relação dos oligonucleotídeos que foram utilizados neste trabalho.

oligonucleotídeo	Seqüência	Referência
25OAS senso	5` -AACTGCTTCCGACAATCAAC- 3`	COELHO <i>et al. 2007</i>
25OAS anti-senso	5`-CCTCCTTCTCCCTCCAAA-3`	
6-16 senso	5`-CATGCGGCAGAAGGCGGTAT-3`	
6-16 anti-senso	5`-CGACGGCCATGAAGGTCAGG-3`	
MxA senso	5`-ATCCTGGGATTTTGGGGCTT-3`	
MxA anti-senso	5`-CCGCTTGTGCTGGTGTGCG-3`	
IFN beta senso	5`-CCTGTGGCAATTGAATGGGAGGC-3`	KIM <i>et al. 2007</i>
IFN beta anti-senso	5`-CCAGGCACAGTGAAGTGTACTCCTT-3`	
IRF-7 senso	5`-CAAGTGCAAGGTGTACTGG-3`	
IRF-7 anti-senso	5`-CAGGTAGATGGTATAGCGTGG-3`	
IFN λ 1 senso	5`-CTTCCAAGCCCACCCCAACT-3`	
IFN λ 1 anti-senso	5`-GGCCTCCAGGACCTTCAGC-3`	
IFN λ 2/3 senso	5`-TTTAAGAGGGCCAAAGATGC-3`	OLIVEIRA D.B. *
IFN λ 2/3 anti-senso	5`-TGGGCTGAGGCTGGATACAG-3`	
IFN alfa senso	5`-TTGACCTTTGCTTTACTGGT-3`	OLIVEIRA D.B. *
IFN alfa anti-senso	5`-CACAAG GGCTGTATTTCTTC-3`	
BETA-ACTINA senso	5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3'	OLIVEIRA D.B. *
BETA- ACTINA anti-senso	5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'	

* Dados não publicados

5.13 TITULAÇÃO DE IFN NO SORO

Após o fracionamento dos PBMCs com ficoll-Paque®, 1 mL de soro foi coletado de cada doador e congelado a -70°C. Posteriormente cada amostra de soro foi diluída em razão de dois (de 1:2 ate 1: 4096) e usado para tratar células Vero com 90% de confluência em placas de 96 câmaras. Dezoito horas após o tratamento, o meio foi descartado e as células infectadas com 10^4 TCID₅₀/mL de EMCV. A infecção foi monitorada por 48h, e após este tempo as placas foram fixadas com 3,7% de formaldeído e corada com cristal violeta 1% (adaptado de FERREIRA PC, 1979). os seguintes controles foram usados : Meio DMEM com 600u/mL de IFN α 2a recombinante (Roche) e soro de amostra negativas adicionadas com 600U/mL IFN α 2a recombinante (Roche).

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Graphpad (USA). foram utilizados o teste t de Student, e as diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

VI. RESULTADOS

6.1 NÍVEL DE mRNA DOS IFNS α , β , λ 1 E λ 2/3

A nível dos mRNAs que codificam para os genes dos IFNs α , β , λ 1 e λ 2/3 foi mensurada por PCR em tempo real através da transcrição reversa do RNA extraído imediatamente após a coleta dos PBMCs de pacientes com SSC ou de pessoas saudáveis. Foi observado que os níveis basais mRNA de IFN α 2 e IFN β está aumentado nos pacientes com SSC enquanto pequenos ou nenhum nível de mRNA desses genes foi observado nos doadores saudáveis (Figura 1, A e B).

Quando foi mensurado o nível de mRNA de IFNs tipo III, foi que os níveis basais de mRNA do IFN λ 1 e IFN λ 2/3 não foi detectado no grupo dos pacientes com SSC e no grupo dos controles (Figura 1, C e D)

Esses resultados foram obtidos com células sem qualquer tratamento ou cultura. Indicando assim que os IFNs α 2 e β podem estar constantemente induzidos em pacientes com SSC.

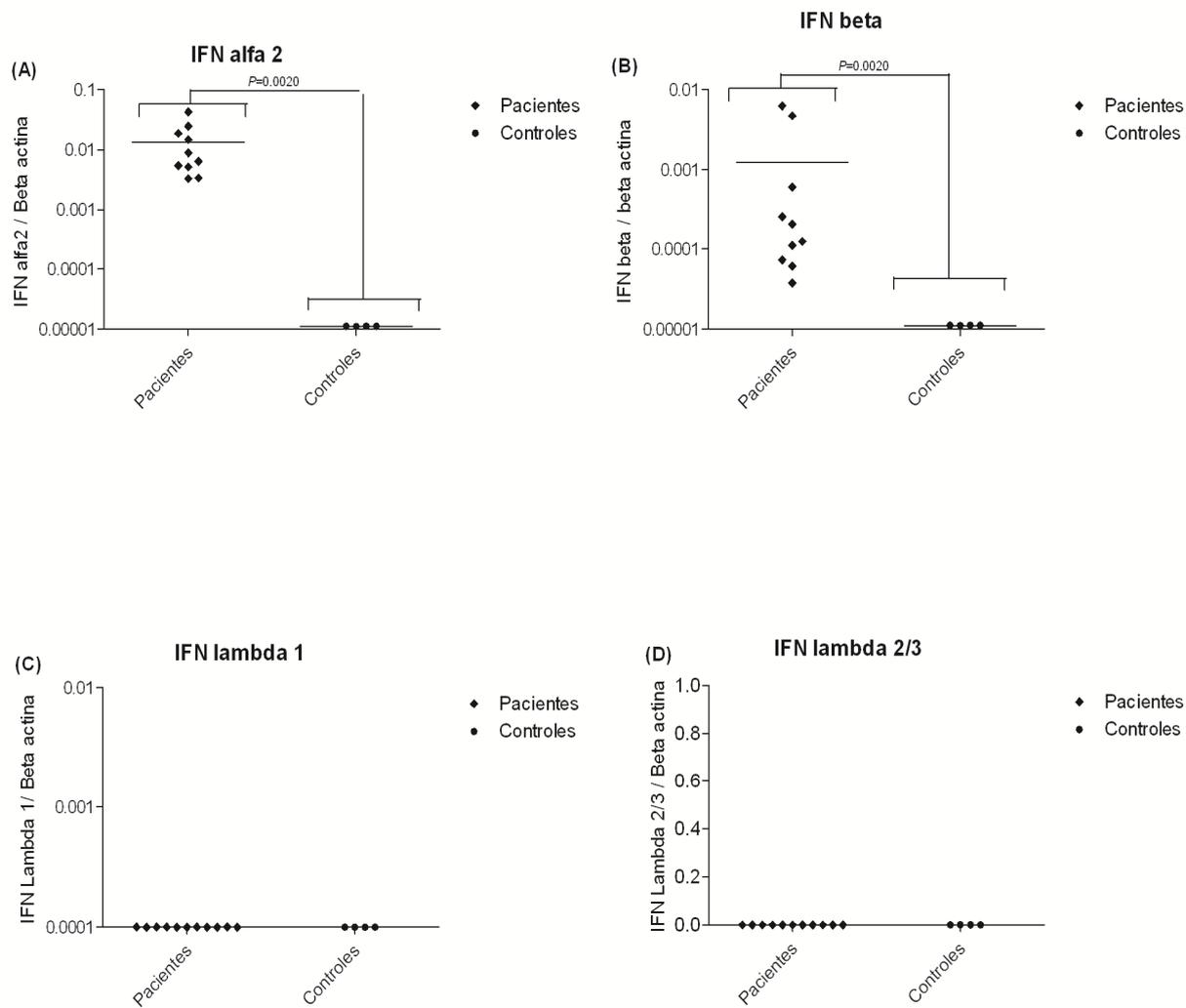


Figura 7: Nível basal de mRNA dos IFNs tipo I e tipo III em PBMCs de doadores saudáveis e de pacientes com SSc - PBMCs de doadores saudáveis e de pacientes com SSc foram fracionados e o RNA total extraído. O RNA obtido foi usado em reações de transcrição reversa e o cDNA resultante foi utilizado em PCRs em tempo real para mensurar mRNA de IFN α (A), IFN β (B), IFN λ 1(C) and IFN λ 2/3 (D).

6.2 TITULAÇÃO DE IFNs NO SORO

Para detectar IFNs no soro dos pacientes com SSc, estes foram titulados em um ensaio biológico utilizado para quantificar biologicamente a atividade dos IFNs. Não foi encontrado no soro a presença de IFNs detectáveis pelo método utilizado, sendo que o limite de detecção foi de 20 U/mL (Figura 8). Neste ensaio foi utilizado um controle no qual foi adicionado 600U/mL IFN α 2a recombinante (Roche) em uma mistura de soros de doadores saudáveis. Com o uso deste controle foi demonstrado que os resultados obtidos não são devidos a toxicidade do soro ou a artefatos da técnica.

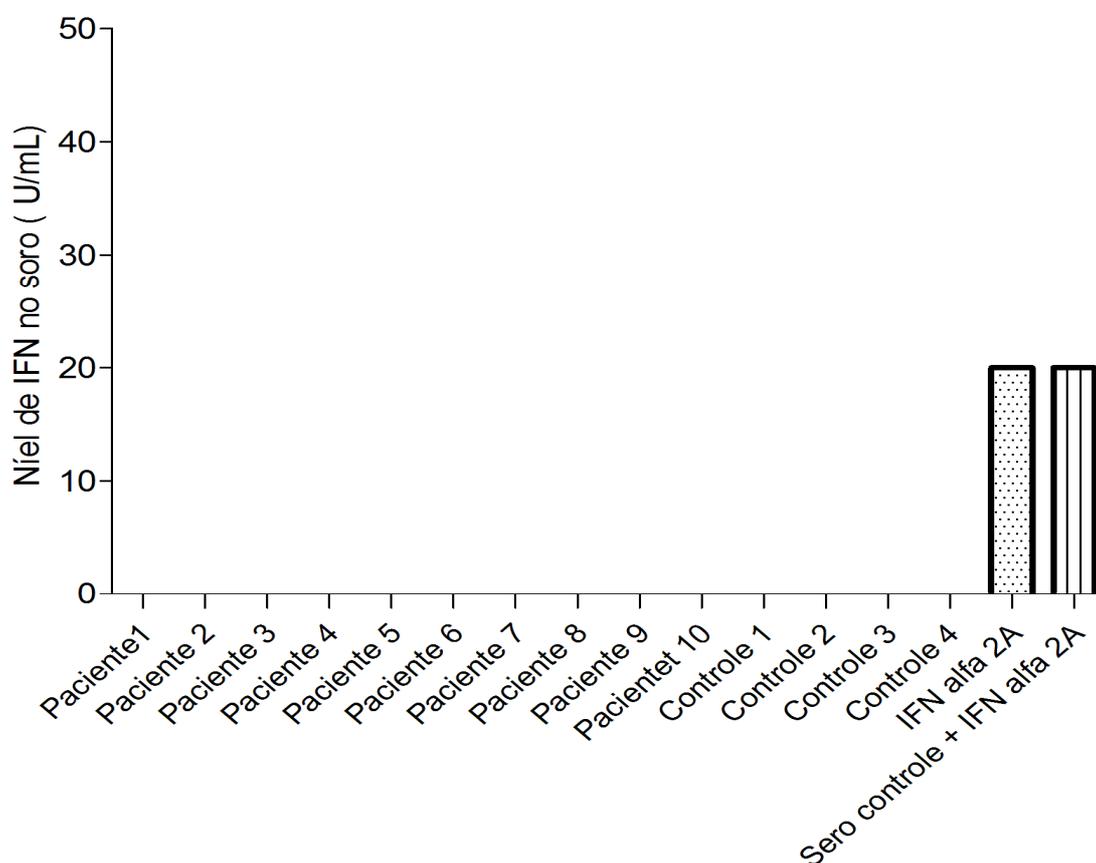


Figura 8: Nível de IFNs no soro dos pacientes com SSc e nos controles. Soros obtidos dos paciente com SSc e controles saudáveis foram titulados. Os soros foram diluída em razão de dois (de 1:2 ate 1: 4096) e usado para tratar células Vero com 90% de confluência em placas de 96 câmaras. Dezoito horas após o tratamento, o meio foi descartado e as células infectadas com 10^4 TCID₅₀/mL de EMCV. A infecção foi monitorada por 48h, e após este tempo as placas foram fixadas com 3,7% de formaldeído e corada com cristal violeta 1%. Foram usados os seguintes controles : Meio DMEM com 600u/mL de IFN α 2a recombinante (Roche) e soro de amostra negativas adicionadas com 600U/mL IFN α 2a recombinante (Roche).

6.3 NÍVEL DE mRNA DOS ISGS 6-16, MXA E 2'5'OAS

Além dos níveis basais de mRNA dos IFNs, também foi mensurado os níveis basais de mRNA de IRF7, 2'5'OAS, MxA e 6-16.

O nível basal de mRNA de IRF-7 não estava diferente nos PBMCs dos pacientes com SSc e nos controles (Figura 9A). De modo contrario foi observado uma diferença no nível basal de mRNA de 2'5'OAS nos pacientes com SSc em relação aos controles (Figura 9B). Um pequeno aumento nos níveis de mRNA de MxA (Figura 9C) e de 6-16 (Figura 9D) foi encontrado nos pacientes em relação aos controles, apesar de que as diferenças não apresentaram significância estatística.

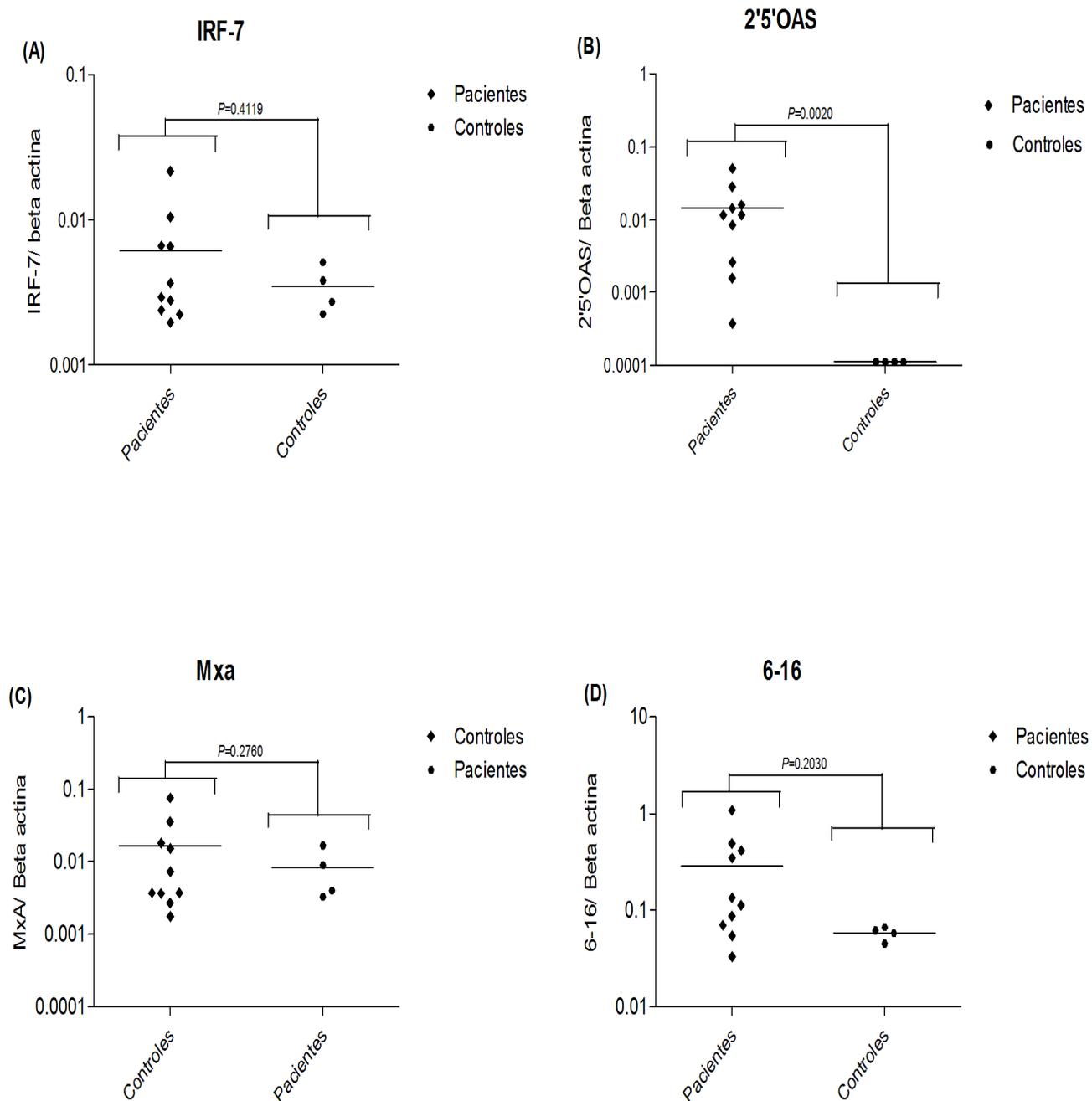


Figura 9: Nível basal de mRNA de IRF-7 e de ISGs em PBMCs de doadores saudáveis e de pacientes com SSc. PBMCs de doadores saudáveis e de pacientes com SSc foram purificados e o RNA total extraído. O RNA obtido foi usado em reações de transcrição reversa e o cDNA resultante foi utilizado em PCRs em tempo real para mensurar IRF-7 (A), 2'5'OAS (B), 6-16 (C) and MxA (D).

6.4 NÍVEL DE mRNA DE IFN β E IFN λ 1 EM PBMCs TRATADOS COM IFN β OU IFN λ 1.

O nível dos mRNAs que codificam os IFNs β e λ 1 foi mensurada em PBMCs de pacientes com SSc e de doadores saudáveis tratados com IFN tipo I e tipo III. PBMCs foram tratados com 1000U/mL de IFNs β ou λ 1. Seis horas após o tratamento o RNA total das células foi extraído e utilizado como molde em reações de transcrição reversa. O cDNA resultante foi utilizado para mensurar o nível dos IFNs por PCR em tempo real.

Após o tratamento dos PBMCs com IFN β , não foi observado diferença nos níveis de mRNA de IFN β (Figura 10A) e λ 1 (Figura 10B) nas células dos pacientes com SSc em relação as células dos controles. Depois do tratamento dos PBMCs com IFN λ 1, também não foi observado diferença no nível de mRNA de IFN β (Figura 11A) e λ 1 (Figura 11B) nas células dos pacientes com SSc em relação as células dos controles após.

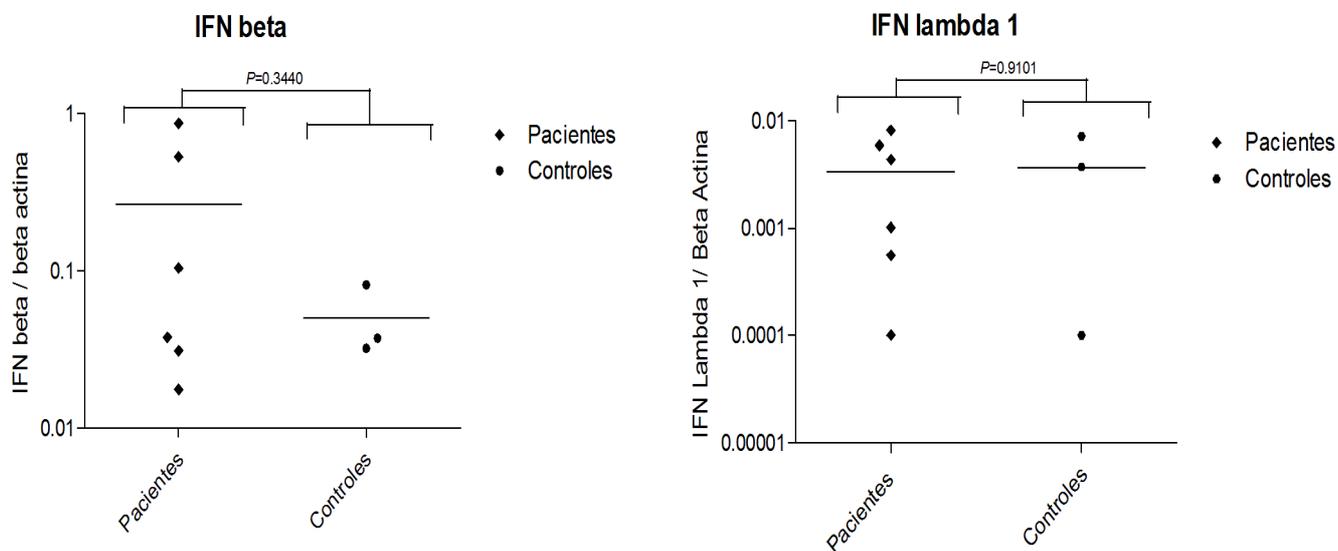


Figura 10: Nível de mRNA de IFN β e IFN λ 1 após tratamento com IFN β . PBMCs de pacientes com SSc e de controles foram tratados com 1000u/mL de IFN β , após 6h o RNA total foi extraído. O RNA obtido foi usado em reações de transcrição reversa e o cDNA resultante foi utilizado em PCRs em tempo real para mensurar o nível de IFN β (A) e IFN λ 1 (B).

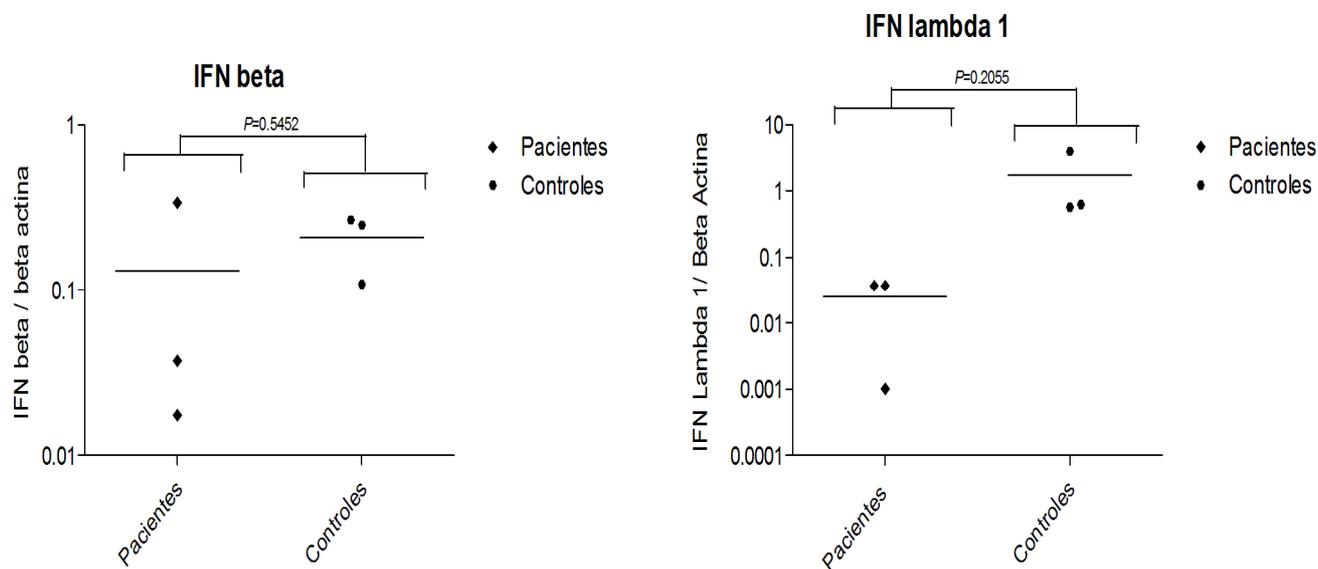


Figura 11: Nível de mRNA de IFN β e IFN λ 1 após tratamento com IFN λ 1.

PBMCs de pacientes com SSc e de controles foram tratados com 1000u/mL de IFN β , após 6h o RNA total foi extraído. O RNA obtido foi usado em reações de transcrição reversa e o cDNA resultante foi utilizado em PCRs em tempo real para mensurar a expressão de IFN β (A) e IFN λ 1 (B).

VII. CONCLUSÕES E DISCUSSÃO

IFNs são citocinas com atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória. Apesar de estudos recentes ter demonstrado a participação de IFNs tipo I na patogênese de autoimunidades, a influencia dos IFNs tipo III nessas doenças ainda é desconhecido. O estudo da participação dos IFNs tipo III nessas doenças torna-se interessante pois os IFN tipo I e III apresentam atividade biológica similar. SSc é uma doença autoimune com etiologia desconhecida, porem é conhecido que nesta doença a homeostase do sistema imune esta gravemente comprometida. Informações sobre a influencia dos IFNs na patogênese e na patologia da SSc são poucas na literatura, assim também são restritas as evidencias sobre a indução basal de IFNs tipo I e III em pacientes com SSc (THEOFILOPOULOS *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2008).

Neste trabalho foi demonstrado que o nível de mRNA de alguns componentes do sistema IFN estão aumentados em PBMCs fracionados “frescos” de pacientes com SSc. O aumento do nível basal de mRNA de IFN $\alpha 2$ e IFN β (IFNs tipo I) foi observada em pacientes com SSc, por outro lado quanto ao nível de mRNA de IFN $\lambda 1$ e IFN $\lambda 2/3$ (IFNs tipo III) não foi observado alteração nos pacientes com SSc quando comparado com os níveis de mRNA em indivíduos saudáveis (Figura 7). Estes resultados mostram que PBMCs de pacientes com SSc tem um aumento no nível de mRNA de IFNs tipo I. Essa alteração no nível de mRNA, especialmente no caso de IFN $\alpha 2$, é condizente com o que acontece em outras doenças autoimunes onde é descrito a participação deste IFN na etiopatogênese e na manutenção dessas doenças, conforme descrito para lupus eritematoso. Um aumento no nível de mRNA de IFN β é grave em doenças autoimunes, pois apesar deste IFN apresentar atividade biológica similar ao IFN α , ele apresenta uma potência mais elevada (MEYER, 2009).

Após a detecção de uma aumento no nível de mRNA de IFN $\alpha 2$ e β , os soros dos pacientes com SSc foram titulados para mensurar a quantidade de IFNs circulante, porem os níveis dos IFNs estava abaixo do limite de detecção do método utilizado (Figura 8). Considerando que o ensaio de titulação é capaz

de detectar qualquer IFN que induza atividade antiviral nas células, pode-se hipotetizar que se algum tipo de IFN estiver aumentado na circulação de pacientes com SSc, este não está em altos níveis. Metodologias mais sensíveis poderão ser usadas para mensurar pequenas quantidades de IFN tipo I no soro dos pacientes (ELORANTA *et al.*, 2010).

O nível de mRNA de IFR-7, um fator de transcrição responsável a IFNs tipo I e III (OSTERLUND *et al.*, 2007), não se apresentou alterado nos pacientes com SSc (FIGURA 9A). Esse achado nos leva a concluir que os níveis de mRNA de IFN α 2 e β estão sendo induzidos por um estímulo que seja específico para esse tipo de IFN, pois este estímulo não leva a indução dos mRNAs de IFNs tipo III (Figura 7 C e D)

Quando foi mensurado o nível de mRNA de 2'5'OAS esse ISG estava aumentado nos pacientes (Figura 9B). Esse mRNA também foi encontrado em nível aumentado em pacientes com lúpus eritematoso (Ye *et al.*, 2007). Esse aumento no nível basal de mRNA de 2'5'OAS corrobora com dados estudos anteriores, onde foi encontrado um aumento na expressão basal de 2'5'OAS em fibroblasto de pacientes com SSc quando comparado com fibroblastos do grupo controle (COELHO *et al.*, 2007). Assim é importante correlacionar estes trabalhos pois eles revelam que algumas alterações no sistema imune estão presentes na pele e no sangue de pacientes com SSc. Foi dosado também o nível de mRNA de outros ISGs, 6-16 e MxA, e estes genes apresentaram pequenas diferenças no nível de mRNA entre pacientes e controles, porém essas diferenças não foram estatísticas (Figura 2, C e D). Os fatores que levam a este perfil de expressão de ISGs não são conhecidos porém pode ser devido a exposição das células a vários subtipos de IFNs expressos durante a doença. A capacidade do soro de pacientes com SSc induzir citocinas em células tratadas (ELORANTA *et al.*, 2010) suporta essa observação, isso é devido provavelmente a presença de citocinas e outras moléculas no plasma dos pacientes.

Neste trabalho também foi estudado a capacidade de PBMCs de pacientes com SSc aumentarem os níveis de mRNA de IFN β e IFN λ 1 após um tratamento com IFN β humano recombinante ou com IFN λ 1 humano recombinante. Foi observado que em células dos pacientes conseguem induzir a síntese de mRNA de IFN β e IFN λ 1 da mesma forma que as células dos doadores saudáveis, após o tratamento com IFN β ou com IFN λ 1. Desta forma foi observado que as células sanguíneas de pacientes com SSc não modificam a capacidade síntese de mRNA de IFNs mesmo com exposição de citocinas circulantes.

Considerando todos esses achados, pode ser hipotetizado que o sistema IFN esta modificado em pacientes com SSc. Por um mecanismo ainda desconhecido, os níveis de mRNA de IFN α 2 e IFN β estão aumentados em pacientes por uma via exclusiva, que não induz IFNs do tipo III. IFNs tipo I produzidos por células circulantes de pacientes com SSc e também por outros tipos celulares após ativação de alguns subtipos de ISGs pode ajudar na manutenção de fenômenos autoimunes na SSc, isso porque essas moléculas são importantes na ligação da resposta imune inata e adaptativa. Assim sendo estes componentes do sistema IFN , dentre outras ações, podem ativar células imunes e aumento a quebra de tolerância levando o sistema a gerar autoanticorpos contra antígenos próprios (MARSHAK-ROTHSTEIN , 2006). Já foi descrito que IFN α 2 é capaz de induzir ativação de TLR3 em fibroblasto de pacientes com SSc em cultura (AGARWAL *et al.*, 2011), e essa ativação pode também estar acontecendo in vivo por IFN tipo I produzidos por PBMCs, corroborando com os outros dados deste trabalho. O aumento da expressão de IFN β em pacientes com SSc é um novo achado para esta doença, isto é de grande importância para o entendimento da alteração na homeostasia imune na SSc. Apesar de várias atividades biológicas do IFNs tipo I e III serem redundantes, neste trabalho foi mostrado que os IFNs tipo III parecem não participar das alterações imunes geradas na células sanguíneas circulantes nos pacientes com SSc.

Os resultados deste trabalho são de grande importância para o entendimento da patogênese e da patologia da SSc. O aumento do nível basal de mRNA de IFN tipo I pode levar a ativação anormal de ISGs e gerar indesejáveis efeitos locais nos pacientes com SSc, mesmo sem a interferência dos IFN tipo III. O perfil diferencial de ISGs encontrados em células sanguíneas é condizente com o perfil encontrado anteriormente em fibroblastos (COELHO *et al.*, 2007), o que nos leva a hipotetizar que este perfil pode ser uma característica relacionada a esta doença. Essa modificação única em relação a resposta a IFNs pode ser considerado como um candidato a biomarcador para SSc.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, D. J. & Varga, J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 26, 587-95 (2005).

Abraham, D. & Distler, O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 2, S2 (2007).

Agarwal, S. K., Wu, M., Livingston, C. K., Parks, D. H., Mayes, M. D., Arnett, F. C. & Tan, F. K. Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 13, R3.

Airo, P., Scarsi, M., Rossi, M. & Mondini, M. Onset and enhancement of systemic sclerosis after treatments for multiple sclerosis. *Rheumatol Int* 28, 703-7 (2008).

Almeida, J. M., "Atividade biológica dos Interferons do tipo III e sua influência na Esclerodermia". 2008. 103f. Tese (Doutorado em microbiologia). Instituto de ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

Almeida, G. M., de Oliveira, D. B., Magalhaes, C. L., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. & Kroon, E. G. Antiviral activity of type I interferons and interleukins 29 and 28a (type III interferons) against Apeu virus. *Antiviral Res* 80, 302-8 (2008).

Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A. R. & Paludan, S. R. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J Virol* 80, 4501-9 (2006).

Assassi, S., Mayes, M. D., Arnett, F. C., Gourh, P., Agarwal, S. K., McNearney, T. A., Chaussabel, D., Oommen, N., Fischbach, M., Shah, K. R., Charles, J., Pascual, V., Reveille, J. D. & Tan, F. K. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum* 62, 589-98.

Atzeni, F., Bardoni, A., Cutolo, M., Hunzelmann, N., Krieg, T., Martini, G., Montecucco, C., Olski, T. M., Secchi, M. E., Valentini, G., Zulian, F. & Sarzi-Puttini, P. Localized and systemic forms of scleroderma in adults and children. *Clin Exp Rheumatol* 24, S36-45 (2006).

Badea, I., Taylor, M., Rosenberg, A. & Foldvari, M. Pathogenesis and therapeutic approaches for improved topical treatment in localized scleroderma and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 48, 213-21 (2009).

Bartlett, N. W., Buttigieg, K., Kotenko, S. V. & Smith, G. L. Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *J Gen Virol* 86, 1589-96 (2005).

Bernatsky, S., Joseph, L., Pineau, C. A., Belisle, P., Hudson, M. & Clarke, A. E. Scleroderma prevalence: demographic variations in a population-based sample. *Arthritis Rheum* 61, 400-4 (2009).

Beutler, B., Jiang, Z., Georgel, P., Crozat, K., Croker, B., Rutschmann, S., Du, X. & Hoebe, K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24, 353-89 (2006).

Bonjardim, C. A. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect* 7, 569-78 (2005).

Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. & Kroon, E. G. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol Lett* 122, 1-11 (2009).

Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R. & Stark, G. R. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6, 975-90 (2007).

Boyum, A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 31-50 (1968).

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S. T., Otte, J. M., Diebold, J., Diepolder, H., Adler, B., Auernhammer, C. J., Goke, B. & Dambacher, J. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289, G960-8 (2005).

Brand, S., Zitzmann, K., Dambacher, J., Beigel, F., Olszak, T., Vlotides, G., Eichhorst, S. T., Goke, B., Diepolder, H. & Auernhammer, C. J. SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 543-8 (2005).

Chung, L., Lin, J., Furst, D. E. & Fiorentino, D. Systemic and localized scleroderma. *Clin Dermatol* 24, 374-92 (2006).

Coccia, E. M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M. E., Julkunen, I., Cella, M., Lande, R. & Uze, G. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 34, 796-805 (2004).

Coelho, L. F., de Oliveira, J. G., de Oliveira, D. B., Guedes, A. C., Lanna, C. C., Prados, R. Z., Ferreira, P. C., Bonjardim, C. A. & Kroon, E. G. Increased expression of 2'5'oligoadenylate synthetase and double-stranded RNA dependent protein kinase messenger RNAs on affected skin of systemic sclerosis patients. *Arch Dermatol Res* 299, 259-62 (2007).

Coelho, L. F., de Oliveira, J. G. & Kroon, E. G. Interferons and scleroderma-a new clue to understanding the pathogenesis of scleroderma? *Immunol Lett* 118, 110-5 (2008).

Denton, C. P. & Black, C. M. Scleroderma--clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 18, 271-90 (2004).

Diaz, M. O., Ziemin, S., Le Beau, M. M., Pitha, P., Smith, S. D., Chilcote, R. R. & Rowley, J. D. Homozygous deletion of the alpha- and beta 1-interferon genes in human leukemia and derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5259-63 (1988).

Dieude, P., Guedj, M., Wipff, J., Ruiz, B., Hachulla, E., Diot, E., Granel, B., Sibilia, J., Tiev, K., Mouthon, L., Cracowski, J. L., Carpentier, P. H., Amoura, Z., Fajardy, I., Avouac, J., Meyer, O., Kahan, A., Boileau, C. & Allanore, Y. STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis. *Arthritis Rheum* 60, 2472-9 (2009).

Dumoutier, L., Tounsi, A., Michiels, T., Sommereyns, C., Kotenko, S. V. & Renauld, J. C. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem* 279, 32269-74 (2004).

Eloranta, M. L., Franck-Larsson, K., Lovgren, T., Kalamajski, S., Ronnblom, A., Rubin, K., Alm, G. V. & Ronnblom, L. Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 69, 1396-402.

Ferreira, P. C., Peixoto, M. L., Silva, M. A. & Golgher, R. R. Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J Clin Microbiol* 9, 471-5 (1979).

Gallagher, G., Megjugorac, N. J., Yu, R. Y., Eskdale, J., Gallagher, G. E., Siegel, R. & Tollar, E. The lambda interferons: guardians of the immune-epithelial interface and the T-helper 2 response. *J Interferon Cytokine Res* 30, 603-15.

Hamming, O. J., Lutfalla, G., Levraud, J. P. & Hartmann, R. Crystal Structure of Zebrafish Interferons I and II Reveals Conservation of Type I Interferon Structure in Vertebrates. *J Virol* 85, 8181-7.

Han, C. S., Chen, Y., Ezashi, T. & Roberts, R. M. Antiviral activities of the soluble extracellular domains of type I interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6138-43 (2001).

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. & Taniguchi, T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 434, 772-7 (2005).

Hou, W., Wang, X., Ye, L., Zhou, L., Yang, Z. Q., Riedel, E. & Ho, W. Z. Lambda interferon inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J Virol* 83, 3834-42 (2009).

Huang, J., Smirnov, S. V., Lewis-Antes, A., Balan, M., Li, W., Tang, S., Silke, G. V., Putz, M. M., Smith, G. L. & Kotenko, S. V. Inhibition of type I and type III interferons by a secreted glycoprotein from Yaba-like disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9822-7 (2007).

Jimenez, S. A. & Derk, C. T. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 140, 37-50 (2004).

Kontsek, P., Karayianni-Vasconcelos, G. & Kontsekova, E. The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members. *Acta Virol* 47, 201-15 (2003).

Kotenko, S. V., Gallagher, G., Baurin, V. V., Lewis-Antes, A., Shen, M., Shah, N. K., Langer, J. A., Sheikh, F., Dickensheets, H. & Donnelly, R. P. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4, 69-77 (2003).

Krause, C. D. & Pestka, S. Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacol Ther* 106, 299-346 (2005).

Levy, D. E. & Garcia-Sastre, A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 143-56 (2001).

Ma, D., Jiang, D., Qing, M., Weidner, J. M., Qu, X., Guo, H., Chang, J., Gu, B., Shi, P. Y., Block, T. M. & Guo, J. T. Antiviral effect of interferon lambda against West Nile virus. *Antiviral Res* 83, 53-60 (2009).

Maitre, A., Hours, M., Bonnetterre, V., Arnaud, J., Arslan, M. T., Carpentier, P., Bergeret, A. & de Gaudemaris, R. Systemic sclerosis and occupational risk factors: role of solvents and cleaning products. *J Rheumatol* 31, 2395-401 (2004).

Marijanovic, Z., Ragimbeau, J., van der Heyden, J., Uze, G. & Pellegrini, S. Comparable potency of IFNalpha2 and IFNbeta on immediate JAK/STAT activation but differential down-regulation of IFNAR2. *Biochem J* 407, 141-51 (2007).

Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 6, 823-35 (2006).

Marsters, S. A., Pennica, D., Bach, E., Schreiber, R. D. & Ashkenazi, A. Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5401-5 (1995).

Matikainen, S., Siren, J., Tissari, J., Veckman, V., Pirhonen, J., Severa, M., Sun, Q., Lin, R., Meri, S., Uze, G., Hiscott, J. & Julkunen, I. Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression. *J Virol* 80, 3515-22 (2006).

Mayes, M. D., Lacey, J. V., Jr., Beebe-Dimmer, J., Gillespie, B. W., Cooper, B., Laing, T. J. & Schottenfeld, D. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 48, 2246-55 (2003).

Meager, A., Visvalingam, K., Dilger, P., Bryan, D. & Wadhwa, M. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine* 31, 109-18 (2005).

Meyer, O. Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine* 76, 464-73 (2009).

Molteni, M., Della Bella, S., Mascagni, B., Bazzi, S., Zulian, C., Compasso, S., Lessi, M. & Scorza, R. Increased interferon-gamma (IFN-gamma) levels produced in vitro by alloactivated T lymphocytes in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *Clin Exp Immunol* 116, 164-8 (1999).

Osterlund, P. I., Pietila, T. E., Veckman, V., Kotenko, S. V. & Julkunen, I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol* 179, 3434-42 (2007).

Oliveira, J., "Análise da expressão gênica em fibroblastos de pacientes com esclerodermia." 1999. 122f. Tese (Doutorado em microbiologia). Instituto de

ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1999.

Pestka, S., Krause, C. D. & Walter, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32 (2004).

Petrillo-Peixoto, M. L., Ferreira, P. C., Mezencio, J. M. & Golgher, R. R. Sensitivity of group C arboviruses (bunyaviridae) to human amnion interferon. *Intervirology* 14, 16-20 (1980).

Prescott, J., Hall, P., Acuna-Retamar, M., Ye, C., Wathelet, M. G., Ebihara, H., Feldmann, H. & Hjelle, B. New World hantaviruses activate IFN λ production in type I IFN-deficient vero E6 cells. *PLoS One* 5, e11159.

Radhakrishnan, R., Walter, L. J., Hruza, A., Reichert, P., Trotta, P. P., Nagabhushan, T. L. & Walter, M. R. Zinc mediated dimer of human interferon-alpha 2b revealed by X-ray crystallography. *Structure* 4, 1453-63 (1996).

Robek, M. D., Boyd, B. S. & Chisari, F. V. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 79, 3851-4 (2005).

Sadler, A. J. & Williams, B. R. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8, 559-68 (2008).

Sen, G. C. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 55, 255-81 (2001).

Sheppard, P., Kindsvogel, W., Xu, W., Henderson, K., Schlutsmeyer, S., Whitmore, T. E., Kuestner, R., Garrigues, U., Birks, C., Roraback, J., Ostrander, C., Dong, D., Shin, J., Presnell, S., Fox, B., Haldeman, B., Cooper, E., Taft, D., Gilbert, T., Grant, F. J., Tackett, M., Krivan, W., McKnight, G., Clegg, C., Foster, D. & Klucher, K. M. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4, 63-8 (2003).

Sontheimer, R. D. Skin manifestations of systemic autoimmune connective tissue disease: diagnostics and therapeutics. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 18, 429-62 (2004).

Stark, J. J., Dillman, R. O., Schulof, R., Wiemann, M. C., Barth, N. M., Honeycutt, P. J. & Soori, G. Interferon-alpha and chemohormonal therapy for patients with advanced melanoma: final results of a phase I-II study of the Cancer Biotherapy Research Group and the Mid-Atlantic Oncology Program. *Cancer* 82, 1677-81 (1998).

Steen, V. D. & Medsger, T. A., Jr. Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 16, 1-10 (1990).

Taniguchi, T. & Takaoka, A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 14, 111-6 (2002).

Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B. & Kono, D. H. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23, 307-36 (2005).

Uze, G., Schreiber, G., Piehler, J. & Pellegrini, S. The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol* 316, 71-95 (2007).

Valentini, G., Baroni, A., Esposito, K., Naclerio, C., Buommino, E., Farzati, A., Cuomo, G. & Farzati, B. Peripheral blood T lymphocytes from systemic sclerosis patients show both Th1 and Th2 activation. *J Clin Immunol* 21, 210-7 (2001).

Yang, K., Puel, A., Zhang, S., Eidenschenk, C., Ku, C. L., Casrouge, A., Picard, C., von Bernuth, H., Senechal, B., Plancoulaine, S., Al-Hajjar, S., Al-Ghonaium, A., Marodi, L., Davidson, D., Speert, D., Roifman, C., Garty, B. Z., Ozinsky, A., Barrat, F. J., Coffman, R. L., Miller, R. L., Li, X., Lebon, P., Rodriguez-Gallego, C., Chapel, H., Geissmann, F., Jouanguy, E. & Casanova, J. L. Human TLR-7-,

-8-, and -9-mediated induction of IFN-alpha/beta and -lambda Is IRAK-4 dependent and redundant for protective immunity to viruses. *Immunity* 23, 465-78 (2005).

Ye, S., Guo, Q., Tang, J. P., Yang, C. D., Shen, N. & Chen, S. L. Could 2'5'-oligoadenylate synthetase isoforms be biomarkers to differentiate between disease flare and infection in lupus patients? A pilot study. *Clin Rheumatol* 26, 186-90 (2007).

Zitzmann, K., Brand, S., Baehs, S., Goke, B., Meinecke, J., Spottl, G., Meyer, H. & Auernhammer, C. J. Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 344, 1334-41 (2006).

IX. ANEXOS

**9.1 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO - INTERNATIONAL JOURNAL
OF RHEUMATOLOGY**

Basal activation of type I interferons (alpha2 and beta) and 2'5'OAS genes: insights into differential expression profiles of interferon system components in systemic sclerosis

Danilo Bretas de Oliveira^{1*}, Gabriel Magno de Freitas Almeida^{1*}, Antônio Carlos Martins Guedes², Flávia Patrícia Sena Teixeira Santos², Claudio Antônio Bonjardim¹, Paulo César Peregrino Ferreira¹, Erna Geessien Kroon¹

¹ Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP 31270-901. Phone: +553134992755. Fax: +553134436482.

² Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Alfredo Balena 110, Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP 30130-100.

Correspondence must be addressed to Erna Geessien Kroon, kroone@icb.ufmg.br

* These authors contributed equally to this work.

Abstract

Objective: Systemic sclerosis (SSc) is a complex autoimmune disease in which interferons (IFNs) may play an essential role. We hypothesized that type I and III IFNs may be found in increased levels on patients and be responsible for SSc autoimmune status. *Methods:* Type I and III IFNs and ISGs basal expression profiles were measured by qPCR using RNA from patients and controls PBMCs. *Results:* Type I IFNs are increased in SSc patients, while no induction of type III IFNs was detected. This induction cannot be related to IRF7, since no upregulation of this gene was seen on patients. Of the ISGs tested, 2'5'OAS levels were increased in patients, while 6-16 and MxA levels were not. *Conclusions:* While there is no indication of type III IFN induction, increased levels of type I IFNs may lead to abnormal regulation of ISGs that can be responsible for immune system alterations described for SSc.

Keywords: Type I and III interferons, alpha2, beta, lambda, autoimmunity, scleroderma, systemic sclerosis (SSc)

1.Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a complex autoimmune disease of unknown aetiology characterized by excessive fibrosis of the skin and internal organs, presence of autoantibodies to nuclear antigens and vascular damage [1-4]. Several genetic and environmental agents have been proposed to be responsible for causing SSc. Among these agents are infections, toxin exposure, single nucleotide polymorphisms (SNPs) and interferon treatment [5-7]. Regardless of the origin, the immune system on SSc patients shows evidence of homeostatic alterations, including increased levels of chemokines in blood serum and different populations of lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In addition to these alterations, there is increased evidence that the interferon (IFN) system is modified in patients with SSc [8-15].

IFNs are immunomodulatory cytokines that act as an important link between the innate and adaptive immune system in vertebrates. IFNs bind to distinct cellular receptors, and their biological activities are mediated by the regulation of interferon stimulated genes (ISGs). IFNs can be divided into three types based on receptor binding and homology. Type I and type III IFNs are important regulators of innate immunity and are produced after stimulation of pattern recognition receptors in order to initiate and regulate the immune response. One of the main pathways leading to type I and III IFNs induction depends on the induction and activation of IRF7. Almost every cell type is able to produce these IFNs after stimulation, but its main producers are cells from the immune system such as plasmacytoid dendritic cells. Type I and III IFNs have redundant biological activities, even though they bind to different cellular receptors and have distinct structures. IFN gamma, the only known type II IFN, has distinct biological activities and is important for the regulation of adaptive immunity [16-17]. The innate immune system and type I IFNs have been proposed as important factors in the initiation and maintenance of some autoimmune diseases, and the influence of type I IFNs in

SSc has not been studied in detail [18-20]. Several activities of type I and type III IFNs are redundant, and until now there has been no description of type III IFNs participation in SSc or other autoimmune diseases. A SNP in one chain of the type III IFNs receptor (IL10R2) has been associated with SSc, indicating that at least responsiveness to these molecules may be important for the disease [21].

Previous studies have shown an increase of several ISGs in PBMCs of patients with autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE) and type I diabetes [10,22]. Differential induction of ISGs in blood cells and fibroblasts from patients has already been described [19,23-25]. When PBMC gene expression was compared by microarray between healthy donors and SSc patients, several ISGs were characterized as differentially induced. Some of these genes were also found in patients with SLE, which is an autoimmune disease marked by several alterations in the type I IFN system [4,24]. Levels of 2'5' oligoadenylate synthetase (2'5'OAS) and double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR), two ISGs, are found at higher levels in fibroblasts from SSc patients when compared to controls [19]. To date, there is no direct evidence of abnormal induction of type I IFNs in SSc, even though cells treated with sera from SSc patients produce more IFN alpha and other cytokines than cells treated with sera from controls [12]. These findings suggest that IFNs may also be important in SSc pathology.

In this paper we show that PBMCs from SSc patients basally expressed more type I IFNs (alpha and beta) than PBMCs from healthy donors. In addition, there was no detectable basal induction of type III IFNs in patients or healthy donors. When ISGs were measured, we observed increased 2'5'OAS basal levels, consistent with previous studies. These findings suggest that, similar to other autoimmune diseases, type I IFNs play an important role in SSc.

2.Methods

2.1 Blood donors: Ten patients fulfilling the American College of Rheumatology preliminary criteria for diagnosis of diffuse SSc and four healthy subjects were chosen as blood donors (Table 1). Before donating blood, each subject read and signed an informed consent previously approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

2.2 Cells and PBMC fractionation: Vero cells (African green monkey kidney cell line) were obtained from the ATCC and grown at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM glutamine, 5% fetal calf serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and antibiotics. PBMCs from healthy donors or SSc patients were purified using the Ficoll Hypaque purification technique [26]. Briefly, fresh blood collected in vacuum tubes containing heparin was diluted in an equal volume of 1X phosphate buffered saline (PBS). Twenty milliliters of the diluted blood were carefully added over 10 ml of Ficoll and centrifuged at 400 × *g* for 30 min. The layer containing PBMCs was collected, washed once in 1X PBS and the cells were counted. One million cells were pelleted and used for RNA extraction.

2.3 RNA extraction, DNase treatment, reverse transcription and quantitative PCR (qPCR): Total cellular RNA was extracted using the RNeasy mini kit (QIAGEN). After the extraction one microgram of RNA was treated with 1U of DNase I enzyme (BIOLABS), and after treatment the RNA was used as template in reverse transcriptions carried out using MMLV reverse transcriptase (PROMEGA). These steps were performed as described by the manufacturers. Real time PCRs were performed in a Step One Real Time PCR Machine (Applied Biosystem) using the relative quantification methodology. The results were analyzed using StepOne Software v2.2 and all data were expressed as a ratio relative to the beta-actin level. PCR primers used for human genes are listed below: IFN alpha2 forward 5'-

TTGACCTTTGCTTTACTGGT-3 and reverse 5'-CACAAAGGGCTGTATTTCTTC-3'. IFN beta forward 5'-CCTGTGGCAATTGAATGGGAGGC-3' and reverse 5'-CAGGTAGATGGTATAGCGTGG-3'. IFN lambda1 forward 5'-CTTCCAAGCCCACCCCAACT-3' and reverse 5'-GGCCTCCAGGACCTTCAGC-3'. IFN lambda2/3 forward 5'-TTTAAGAGGGCCAAAGATGC-3' and reverse 5'-TGGGCTGAGGCTGGATACAG-3'. IRF-7 forward 5'-CAAGTGCAAGGTGTACTGG-3' and reverse 5'-CAGGTAGATGGTATAGCGTGG-3'. 2'5'OAS forward 5'-AACTGCTTCCGACAATCAAC-3' and reverse 5'-CCTCCTTCTCCCTCCAAAA-3'. MxA forward 5'-ATCCTGGGATTTTGGGGCTT-3' and reverse 5'-CCGCTTGTGCTGGTGTGCG-3'. 6-16 forward 5'-CATGCGGCAGAAGGCGGTAT-3' and reverse 5'-CGACGGCCATGAAGGTCAGG-3'. Beta-actin forward 5'-CCAACCGCGAGAAGATGA-3' and reverse 5'-CCAGAGGCGTACAGGGATAG-3'.

2.4 IFN titration: After cell fractionation by Ficoll Hypaque, one milliliter of sera was collected from each donor and frozen at -70°C until use. At the time of titration, each serum sample was serially diluted from 1:2 to 1:4096 and used to treat 96-well plates of Vero cells with 90% confluency. Eighteen hours after treatment, the medium was discarded and the cells were infected with 10⁴ TCID₅₀/ml of *Encephalomyocarditis virus* (EMCV). The infection was monitored for 48 hours, at which time the plates were fixed with 3.7% formaldehyde before being stained with 1% crystal violet (adapted from [27]). Alongside the samples the following controls were used: 600U/ml of recombinant human IFN alpha 2a (Roche) and a negative serum sample to which 600U/ml of recombinant human IFN alpha 2a (Roche) was added.

2.5 Statistical analysis: Student's T-test and non parametric Mann-Whitney test were used to analyze the results. Differences of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Analyses were made using the GraphPad Software (USA).

3.Results

The expression profile of type I and type III IFNs was measured by qPCR using RNA from PBMCs freshly collected from SSc patients or controls. We observed that the basal levels of IFN alpha2 and IFN beta were increased in patients while there was little or no expression of these genes on healthy donors (Figure 1, A and B). When type III IFNs were measured, we observed that the basal level of IFN lambda1 and lambda2/3 was the same between both groups (Figure 1, C and D). These results were obtained from cells without any treatment or culture, indicating that these genes might be normally induced in patients. We also attempted to detect IFN proteins in sera from patients and controls through a biological assay commonly used for IFN titration. However we were unable to detect any activity higher than the detection limit of the assay (20 IU/ml). Our controls worked perfectly, indicating that the negative results obtained were not due to sera toxicity or experimental artifacts (data not shown).

In addition to IFN basal levels, we also measured IRF7, 2'5'OAS, MxA and 6-16 basal levels in PBMCs from patients and controls. IRF7 is an important factor for type I and type III IFN induction, whereas the other genes are ISGs that are commonly induced by type I and type III IFNs. There was no statistically significant difference in the levels of IRF7 (Figure 2A) between patients and controls. Similarly, there was no difference between levels of MxA (Figure 2C) and 6-16 (Figure 2D). However a difference on 2'5'OAS levels was detected, and this gene basal expression level was increased in patients but not in controls (Figure 2B).

4.Conclusions

IFNs are cytokines with antiviral, antiproliferative and immunomodulatory activities. Type I IFNs have been implicated in the pathogenesis of several known autoimmune diseases. However, the influence of type III IFNs in these diseases is not yet known, despite the

similarities in the biological activities of these IFN types. SSc is an autoimmune disease with unknown etiology in which the immune system homeostasis is severely compromised. To date there has been little information about the influence of IFNs in SSc patients in the literature, and no direct evidence of type I or type III IFNs basal induction in patients.

In this paper we show that some components of the IFN system can be found at higher levels in freshly purified PBMCs from SSc patients, compared with cells from controls. Increased basal expression of IFN alpha2 and IFN beta (type I IFNs) was detected in SSc patients, while there was no difference between the basal levels of IFN lambda1 and IFN lambda2/3 (type III IFNs) in patients and controls (Figure 1). These results show that, at least for mRNA levels, there is a higher expression of type I IFNs by PBMCs from SSc patients than from controls. This abnormal expression, especially in the case of IFN alpha2, is consistent with the status of autoimmunity in several other diseases and can have a major role in initiating and maintaining the disease. High levels of IFN beta can be even more dramatic for an autoimmune status, since this IFN has similar biological activities to IFNs alpha but is even more potent [28]. We also tried to titrate IFN protein levels on sera obtained from patients and controls, but the levels were below our limit of detection (20 IU/ml). Considering that this titration method is able to detect any mixture of IFNs capable of inducing antiviral activity in host cells, we can hypothesize that even though IFN levels are increased on SSc, they are not found in high levels. Methodologies with greater sensitivity must be used in order to detect and measure type I IFNs proteins in SSc patients sera.

Expression levels of IRF7, an inducible transcription factor responsible for type I and type III IFN gene induction [29], were not altered between patients and controls (Figure 2A). This finding leads us to conclude that IFN alpha2 and beta are being induced by another stimulus in the disease, that is specific to their induction and is not common to type III IFNs induction. 2'5'OAS basal expression levels were higher in patients than in controls (Figure 2B).

This gene is also found at higher levels in SLE patients [30]. Differential induction of 2'5'OAS is consistent with a previous study that used fibroblasts from SSc patients, in which higher basal levels of 2'5'OAS were detected when compared to control fibroblasts [19]. It also indicates that there is, at least to some degree, some similarity between alterations in the skin and blood cells of SSc patients. Other measured ISGs, 6-16 and MxA, were not differentially expressed between patients and controls (Figure 2, C and D). The factors leading to this differential induction on ISGs are unknown, but could be due to cell exposure to various IFN subtypes abnormally expressed during the disease. The capacity of SSc sera to induce cytokines in treated cells [31] supports this observation, since this activation probably occurs due to cytokines and other molecules in the plasma.

Based on these findings, we hypothesize that the IFN system is modified in SSc. By still unknown mechanisms, at least IFNs alpha2 and IFN beta are induced in patients by a pathway that does not induce type III IFNs. Type I IFNs produced by patients cells circulates and through activation of certain subsets of ISGs maintains the autoimmune status of SSc. These molecules are important links between innate and adaptative immune responses and can, among other actions, activate immune cells to improve autoantigens detection and autoantibodies production [32]. It has been already described that IFN alpha2 can induce TLR3 activation in SSc fibroblasts in culture [33]. This activation can also be happening *in vivo* by type I IFNs naturally produced by PBMCs, corroborating our hypothesis. IFN beta activation is a novel finding on the disease and can be of great importance to SSc altered immune homeostasis. Even though there is some redundancy between the activity of type I and type III IFNs, we could not link type III IFNs to SSc, at least when PBMCs are involved. Future experiments with higher sample size and using distinct cell populations isolated from total PBMCs are essential to further investigate these results.

These findings are of great importance to our understanding of the pathogenesis and pathology of SSc. Increased basal levels of type I IFNs can lead to abnormal activation of ISGs and undesirable side effects on the patients, even without interference by type III IFNs. The differential expression profile of ISGs detected in PBMCs is consistent with the profile found previously in fibroblasts [19], and could be a signature related to the disease. These unique modifications in the IFN response may be considered as candidates for SSc biomarkers, and can be considered for further studies as diagnostic tools for SSc

5.Acknowledgments

We would like to thank Lopes AS ; Santos JR ; Carvalho AA and Andrade KR for their secretarial/technical assistance. This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Oliveira DB and Almeida GMF received fellowship from CNPq. ACM Guedes, CA Bonjardim, EG Kroon, FPST Santos and PCP Ferreira are recipients of research fellowships from CNPq.

6. References

- [1] Steen VD. Systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16(3):641-54.
- [2] Sontheimer RD. Skin manifestations of systemic autoimmune connective tissue disease: diagnostics and therapeutics. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004;18(3):429-62.
- [3] Denton CP, Black CM. Scleroderma--clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004;18(3):271-90.
- [4] Chizzolini C, Brembilla NC, Montanari E, Truchetet ME. Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmun Rev*;10(5):276-81.
- [5] Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 2005;26(11):587-95.
- [6] Rose NR, Leskovsek N. Scleroderma: immunopathogenesis and treatment. *Immunol Today* 1998;19(11):499-501.
- [7] Tahara H, Kojima A, Hirokawa T, et al. Systemic sclerosis after interferon alphacon-1 therapy for hepatitis C. *Intern Med* 2007;46(8):473-6.
- [8] Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum*;62(2):589-98.
- [9] Allanore Y, Borderie D, Hilliquin P, et al. Low levels of nitric oxide (NO) in systemic sclerosis: inducible NO synthase production is decreased in cultured peripheral blood monocyte/macrophage cells. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40(10):1089-96.
- [10] Coelho LF, de Oliveira JG, Kroon EG. Interferons and scleroderma-a new clue to understanding the pathogenesis of scleroderma? *Immunol Lett* 2008;118(2):110-5.

- [11] Sakkas LI, Tourtellotte C, Berney S, Myers AR, Platsoucas CD. Increased levels of alternatively spliced interleukin 4 (IL-4delta2) transcripts in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(5):660-4.
- [12] Molteni M, Della Bella S, Mascagni B, et al. Increased interferon-gamma (IFN-gamma) levels produced in vitro by alloactivated T lymphocytes in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *Clin Exp Immunol* 1999;116(1):164-8.
- [13] Yamamoto T, Katayama I, Nishioka K. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1998;25(2):314-7.
- [14] Ihn H, Sato S, Fujimoto M, et al. Circulating intercellular adhesion molecule-1 in the sera of patients with systemic sclerosis: enhancement by inflammatory cytokines. *Br J Rheumatol* 1997;36(12):1270-5.
- [15] Valentini G, Baroni A, Esposito K, et al. Peripheral blood T lymphocytes from systemic sclerosis patients show both Th1 and Th2 activation. *J Clin Immunol* 2001;21(3):210-7.
- [16] Kontsek P, Karayianni-Vasconcelos G, Kontsekova E. The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members. *Acta Virol* 2003;47(4):201-15.
- [17] Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8-32.
- [18] Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006;25(3):383-92.

- [19] Coelho LF, de Oliveira JG, de Oliveira DB, et al. Increased expression of 2'5'oligoadenylate synthetase and double-stranded RNA dependent protein kinase messenger RNAs on affected skin of systemic sclerosis patients. *Arch Dermatol Res* 2007;299(5-6):259-62.
- [20] Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005;23:307-36.
- [21] Hikami K, Ehara Y, Hasegawa M, et al. Association of IL-10 receptor 2 (IL10RB) SNP with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;373(3):403-7.
- [22] Crow MK, Kirou KA. Interferon-induced versus chemokine transcripts as lupus biomarkers. *Arthritis Res Ther* 2008;10(6):126.
- [23] Farina G, Lafyatis D, Lemaire R, Lafyatis R. A four-gene biomarker predicts skin disease in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*;62(2):580-8.
- [24] Tan FK, Zhou X, Mayes MD, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(6):694-702.
- [25] Christmann RB, Hayes E, Pendergrass S, et al. Interferon and alternative activation of monocyte/macrophages in systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension. *Arthritis Rheum*;63(6):1718-28.
- [26] Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968;97:77-89.
- [27] Ferreira PC, Peixoto ML, Silva MA, Golgher RR. Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J Clin Microbiol* 1979;9(4):471-5.

[28] Marijanovic Z, Ragimbeau J, van der Heyden J, Uze G, Pellegrini S. Comparable potency of IFN α 2 and IFN β on immediate JAK/STAT activation but differential down-regulation of IFNAR2. *Biochem J* 2007;407(1):141-51.

[29] Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN- λ) genes. *J Immunol* 2007;179(6):3434-42.

[30] Ye S, Guo Q, Tang JP, Yang CD, Shen N, Chen SL. Could 2'5'-oligoadenylate synthetase isoforms be biomarkers to differentiate between disease flare and infection in lupus patients? A pilot study. *Clin Rheumatol* 2007;26(2):186-90.

[31] Eloranta ML, Franck-Larsson K, Lovgren T, et al. Type I interferon system activation and association with disease manifestations in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*;69(7):1396-402.

[32] Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2006;6(11):823-35.

[33] Agarwal SK, Wu M, Livingston CK, et al. Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts. *Arthritis Res Ther*;13(1):R3.

Table 1 -Information about the subjects that consented to take part in this research.

	Sex	Age (years)	Disease time (years) ¹	Treatment	ANA titer
P1	F	31	1	Prednisone	> 1/320
P2	F	54	5	Methotrexate Prednisone	<1/10240
P3	M	35	5	Methotrexate Prednisone	> 1/5120
P4	M	29	1	Prednisone	> 1/640
P5	M	40	7	-	<1/10240
P6	F	30	2	-	>1/320
P7	F	50	5	-	>1/80
P8	M	56	6	-	<1/10240
P9	F	58	11	Methotrexate Prednisone	> 1/80
P10	F	70	20	-	>1/640
C1	M	39	-	-	Not tested
C2	F	32	-	-	Not tested
C3	M	25	-	-	Not tested
C4	F	24	-	-	Not tested

C: control ; P: patient ; M: male ; F: female ; - : not treated.

¹ Dated from the onset of the first non-Raynaud's symptom.

7.Figures

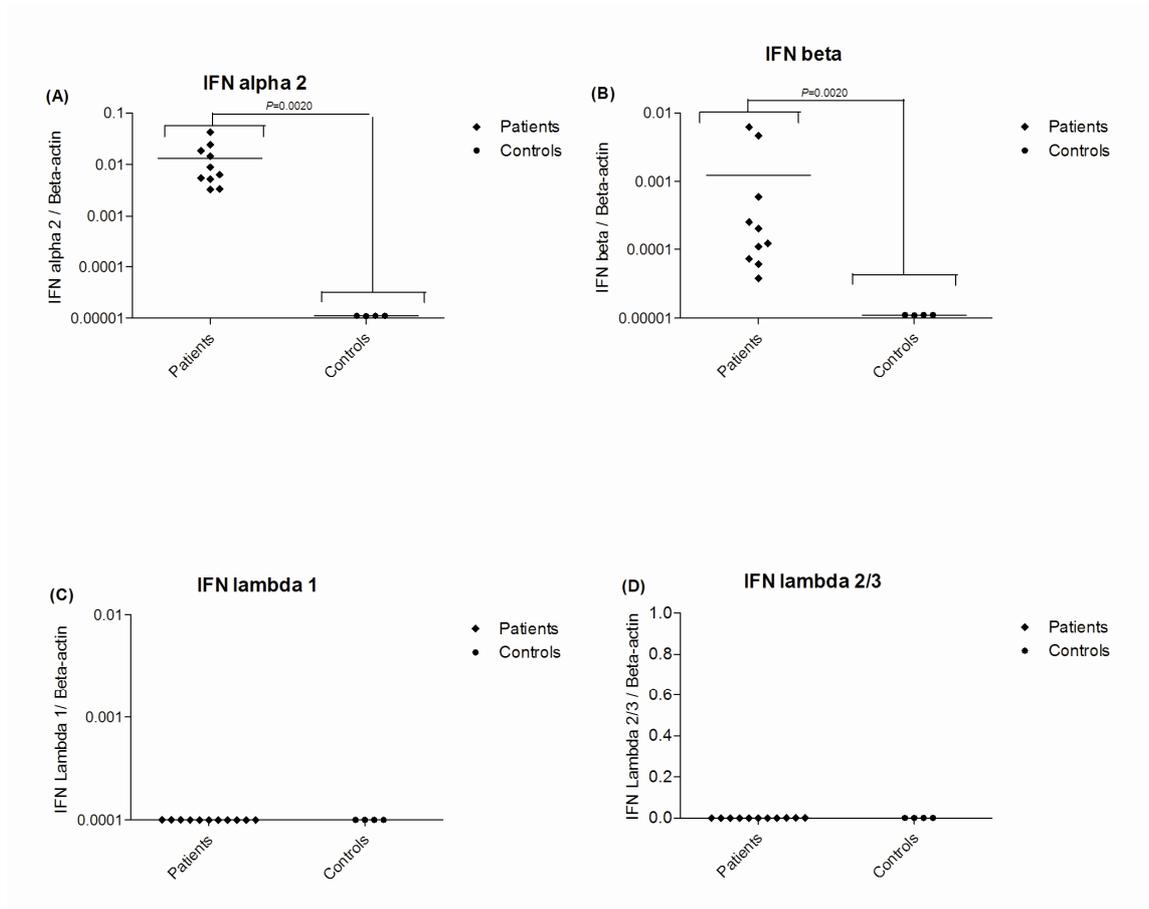


Figure 1: Type I and type III IFN mRNA basal levels in PBMCs from healthy donors and SSc patients. PBMCs from healthy donors and SSc patients were purified and total RNA extraction was performed. The RNA obtained was used as template in reverse transcription reactions, and the resulting cDNA was used in real time PCRs to measure IFN alpha (A), IFN beta (B), IFN lambda1 (C) and IFN lambda 2/3 (D).

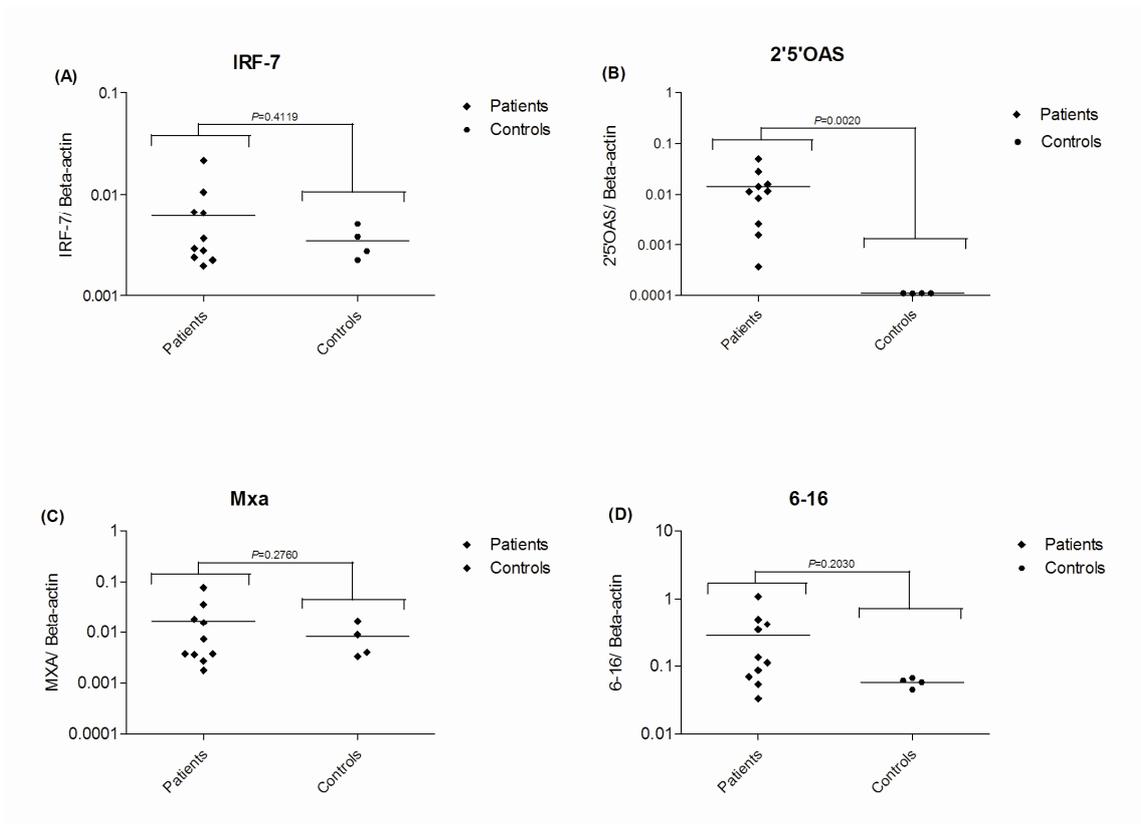


Figure 2: Basal levels of IRF-7 and ISGs in PBMCs from healthy donors and SSc patients.

PBMCs from healthy donors and SSc patients were purified and total RNA extraction was performed. The RNA obtained was used as template in reverse transcription reactions, and the resulting cDNA was used in real time PCRs to measure IRF-7 (A), 2'5'OAS (B), 6-16 (C) and MxA (D) levels.