

MARCELA DOS ANJOS MEDICI

**“CLONAGEM E EXPRESSÃO DA AQUAPORINA-4
RECOMBINANTE EM *E. COLI* PARA APLICAÇÃO NO
IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROMIELITE ÓTICA”**

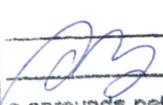
**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARCELA DOS ANJOS MEDICI

**“CLONAGEM E EXPRESSÃO DA AQUAPORINA-4
RECOMBINANTE EM *E. COLI* PARA APLICAÇÃO NO
IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROMIELITE ÓTICA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Biologia
Molecular, na área de Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M468c Medici, Marcela dos Anjos, 1985-
Clonagem e expressão da aquaporina-4 recombinante em *E. coli* para aplicação no imunodiagnóstico da neuromielite ótica / Marcela dos Anjos Medici. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Neuromielite ótica. 2. Aquaporina 4. 3. Proteínas recombinantes. 4. Clonagem. 5. Genética - Expressão. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Cloning and expression of recombinant aquaporin-4 in *E. coli* for neuromyelitis optica immunodiagnosis

Palavras-chave em inglês:

Neuromyelitis optica

Aquaporin 4

Recombinant proteins

Cloning

Gene expression

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Marcos Tadeu dos Santos

Data de defesa: 17-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 17 de maio de 2013.

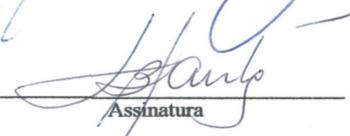
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador)



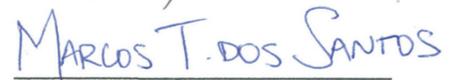
Assinatura

Profª. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos



Assinatura

Dr. Marcos Tadeu dos Santos



Assinatura

Dr. Marcos Roberto Dias Batista

Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira

Assinatura

“I get by with a little help from my friends...”

Paul McCartney e John Lennon (1940-1980)

AGRADECIMENTOS

O primeiro dos agradecimentos vai com certeza aos meus pais, que foram sempre mais que pais. Foram mentores, ombros para se chorar, amigos, investidores e me mostraram o significado mais puro de ser amado. Amo vocês!

A toda a minha família que sempre esteve ao meu lado, me ajudando, nem que fosse simplesmente me distraíndo dos meus problemas e trazendo mais alegria para a minha vida. Um obrigada especial às minhas duas irmãs lindas, Julia e Valentina.

Àquele que se tornou a razão da minha vida, que me traz amor e segurança todos os dias, meu marido lindo, Alessandro, de quem tenho a mais profunda admiração e quem eu amo com toda intensidade.

Pela orientação e oportunidade de mudar a minha vida, agradeço ao meu orientador Marcelo Brocchi.

Um agradecimento muito mais que especial para aquele que se tornou muito mais que um colega de trabalho, que foi um professor e amigo e esteve comigo nos bons e nos maus momentos e sempre conseguiu me manter com um sorriso no rosto e esperança no coração, Marcos. Eu escreveria mais se você já não soubesse tudo que penso sobre a nossa amizade. Você faz toda a falta do mundo!

Aos melhores amigos do mundo, sem os quais eu não sobreviveria: Nádia, Thalita, Rato, Andrea, Debora, Maria Letícia, Juliana, Fabio, Mariana, e tantos outros. Minha vida é sempre melhor por vocês estarem nela!

Aos colegas de trabalho que tornaram a vida no laboratório mais interessante: Igor, Diego, Camila, Meire, Jéssica, Bruna, Tamires, Ana, Meiriele, Fernanda, Fabio, Camilinha, Adriane. Um agradecimento especial para Gui, Cati e Luzinha, que me mantiveram sã nos momentos mais importantes e fizeram meus dias mais felizes. Nunca esquecerei o apoio e a amizade sincera!

Agradeço também a todos os integrantes do laboratório de Neuroimunologia, pela amizade, pelo apoio moral e técnico e por me acolherem como uma de vocês.

Agradeço ao Evandro, Isildinha e Sandra, pelo apoio técnico.

Ao CNPQ, pela breve mas importantíssima ajuda financeira.

RESUMO

A neuromielite ótica (NMO) é uma doença inflamatória do sistema nervoso central. Por muito tempo, a NMO foi considerada uma variante da Esclerose Múltipla (EM). Atualmente, as duas doenças são distinguidas por meio de exames da neuroimagem e achados laboratoriais. Em 2004, mostrou-se a presença de um anticorpo, inicialmente nomeado de anti-NMO, em 85% dos pacientes portadores de NMO. Pacientes com EM clássica não apresentam esse anticorpo em seu soro. Através de técnicas de imunofluorescência indireta, em que o soro do paciente entra em contato com tecido de SNC de camundongos ou de macacos, mostrou-se que o alvo desse anticorpo era a aquaporina-4 (AQP4). Alguns pacientes podem apresentar também autoanticorpos que reconhecem a mielina de oligodendrócito (MOG). A obtenção da AQP4 recombinante seria de grande importância para aplicação em imunodiagnóstico e pesquisa científica. Como a AQP4 é uma proteína transmembrânica, visamos nesse trabalho melhorar o rendimento e a solubilização da proteína recombinante. Buscando maximizar o processo de expressão da AQP4 em *E. coli*, foram escolhidos vetores de expressão e linhagens apropriadas para expressão de proteínas heterólogas recombinantes. Ainda, foram utilizados alguns artifícios moleculares, como a utilização de proteínas e tags de fusão e o aprimoramento do processo de extração proteica. Desta forma, neste estudo descrevemos a clonagem e expressão da AQP4 humana e a detecção de anticorpos anti-MOG no soro de pacientes com diagnóstico de NMO.

ABSTRACT

Neuromyelitis optica (NMO) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS). For a long time, NMO was considered a Multiple Sclerosis (MS) variant. Nowadays, the two diseases are differentiated by neuroimaging exams and laboratorial findings. In 2004 was shown the presence of an antibody, initially named anti-NMO, in 85% of NMO patients. Classic MS patients were tested seronegative for this antibody. Through indirect immunofluorescence techniques, in which patient's serum and CNS tissue from mice and monkeys are in contact with each other, was shown that the antibody's target was aquaporin-4 (AQP4). Some patients can also present autoantibodies against myelin oligodendrocyte protein (MOG). The attainment of recombinant AQP4 would be of great importance for immunodiagnosis and scientific research applications. As the AQP4 is a transmembranic protein, the improvement of the recombinant protein yields and its solubility were envisioned for this study. Seeking to maximize the AQP4 expression process in *E. coli*, we chose expression vectors and specific safe lineages for heterologous recombinant protein expression. Moreover, molecular artifice was utilized, as fusion proteins and tags and the enhancement of protein extraction process. Therefore, the purpose of this study was to clone and express human AQP4 and the detection of anti-MOG antibodies in NMO patients' serum.

LISTA DE ABREVIATURAS

AQP4 – Aquaporina-4

AQP4r – Aquaporina-4 recombinante

atm – Atmosfera

BBB – Barreira hematoencefálica

Can – Canamicina

cDNA – DNA complementar

Clo - Cloranfenicol

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase - Desoxirribonuclease

DO – Densidade Óptica

DTT – Ditioltreitól

EAE – Encefalomielite experimental autoimune

EDSS - Escala expandida de status de desabilidade

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EM – Esclerose Múltipla

GST – Glutathiona S-transferase

g – Grama

IgG – Imunoglobulina G

IPTG - *Isopropiltiogalactosídeo*

kb - Kilobase

kDa – Kilodalton

kV - Kilovolt

LB – Meio Luria Bertani

LCR – Líquido Cefalorraquiano

LETM – Mielite transversa extensa

M – Molar

MAG – Glicoproteína associada a mielina

MBP – Proteína básica de mielina

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – Milimolar

MOG – Mielina de oligodendrócito

mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro

nm - Nanômetro

NMO – Neuromielite ótica

NO – Neurite ótica

pb – Pares de Bases

PBS – Tampão fosfato salino

PBST – PBS-TWEEN20

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLP – Proteína proteolipídica

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PSA – Persulfato de Amônio

RNA – Ácido Ribonucleico

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Gel de Eletroforese de Poliacrilamida com Dodecil sulfato de sódio

SNC – Sistema nervoso central

SUMO - *Small Ubiquitin-like Modifier*

TBST – TBS-TWEEN20

tRNA – Ácido Ribonucleico transportador

V – Volt

°C – Graus Celsius

μF - Microfaraday

μg – Micrograma

μL – Microlitro

Ω - Ohm

ÍNDICE

1. Introdução.	1
2. Objetivos.	14
3. Materiais e Métodos.	15
3.1 Pacientes.	15
3.2 Meios de cultura e estocagem de linhagens e bactérias.	15
3.3 Linhagens Bacterianas e preparo de células eletrocompetentes.	16
3.4 Plasmídeos.	17
3.5 Antibióticos.	17
3.6 Construção dos clones.	18
3.6.1 Construção 1 – pET28a-AQP4.	18
3.6.2 Construção 2 – pET28a-GST-AQP4.	20
3.6.3 Construção 3 – pETSUMO-AQP4.	21
3.7 Construção das linhagens de expressão.	22
3.8 Indução da expressão de proteínas por IPTG.	23
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	24
3.9.1 Coloração por <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	25
3.9.2 Western-blot.	25
3.10 Ensaio para detecção de anti- aquaporina-4.	26
3.11 ELISA.	27
4. Resultados.	29
4.1 Pacientes.	29

4.2 Ensaio de Imunofluorescência para detecção de anti- aquaporina-4.	30
4.3 Construção 1 – pET28a-AQP4.	31
4.4 Construção 2 - pET28a-GST-AQP4.	40
4.5 Construção 3 – pET SUMO-AQP4.	49
4.6 ELISA.	57
5. Discussão.	59
6. Conclusões.	65
7. Referências.	66
8. Anexos.	76

1. Introdução

As doenças inflamatórias desmielinizantes do sistema nervoso central são as maiores causadoras de déficit neurológico que acometem o ser humano, excluindo os episódios traumáticos. A neuromielite ótica (NMO) ou doença de Devic é uma doença autoimune, inflamatória e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por graves ataques de neurite ótica e mielite transversa, que ao contrário da esclerose múltipla (EM), na maioria dos casos, não envolve lesões no cérebro, pelo menos na fase inicial da doença. A NMO foi inicialmente descrita em 1870 por Albutt, que reportou um paciente com mielite transversa e anormalidade na visão. Vinte e quatro anos depois, em 1894, Devic e Gault descreveram a neurite ótica e a mielite transversa como condição *sine qua non* para o diagnóstico da NMO (1). A incidência e prevalência da NMO ainda não estão completamente definidas, porém alguns estudos ajudaram a iniciar os parâmetros da doença. Trabalhos realizados no Japão, Cuba, Dinamarca, México e França mostraram que a prevalência da NMO pode variar de 0,5 a 4,4 a cada 100.000 pessoas nesses países (2, 3, 4, 5, 6). A incidência da NMO varia bastante de acordo com a região, mas parece ser maior em não-caucasianos (7). A média de idade do primeiro ataque é de aproximadamente 39 anos, porém a doença também pode afetar crianças e idosos (8, 9). A doença pode seguir dois cursos: monofásico e de surto e remissão. Cerca de 70% dos pacientes de NMO seguem o curso de surto e remissão (10, 11). No curso monofásico, o paciente apresenta somente um surto e entra em recuperação, que na maioria dos casos é incompleta. No curso de surto e remissão, 1/3 dos pacientes chega a óbito (10, 11, 12). As manifestações clínicas na NMO podem,

então, ser reversíveis, porém são comumente mais graves que aquelas descritas na EM clássica. Finalmente, a NMO pode levar os pacientes à cegueira uni ou bilateral, paralisia, disfunções de bexiga e intestino, insuficiência respiratória e morte (7, 13, 14). Dentro de 5 anos após o início dos sintomas, cerca de 50% dos pacientes já perderam a visão em pelo menos um dos olhos ou tornou-se incapaz de caminhar sem assistência (11). Ainda, a NMO no curso de surto e remissão é de 6 a 9 vezes mais prevalente em mulheres do que em homens no curso de surto e remissão (1). A incidência de outras doenças autoimunes em pacientes com NMO pode ser 15 vezes maior em relação a população geral e a associação da NMO com doenças autoimunes como tireoidites, lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjogren ajudou a fornecer evidências sobre a natureza autoimune dessa doença (1).

Sintomas não imediatamente relacionados a disfunções neurológicas como vômito, soluços, visão embaçada, dor nos olhos, fraqueza e espasmos nas pernas podem se apresentar em pacientes com NMO, no início da doença, o que dificulta o diagnóstico preciso da doença (15, 16, 17, 18). Além disso, quando o paciente já apresenta os sintomas neurológicos clássicos, existe frequentemente uma sobreposição desses sintomas com os de outras doenças neurológicas, principalmente de caráter autoimune, como a EM.

Por muito tempo, a NMO foi considerada uma variante da EM, uma vez que a neurite ótica, a mielite transversa e inflamação desmielinizante estão presentes nas duas doenças (1). Mesmo que os critérios de diagnósticos para a NMO estejam em constante mudança, já é bastante claro que se trata de uma doença distinta e não uma variante da EM, já que essas doenças apresentam características clínicas, patológicas e radiológicas

distintas entre si (19). A NMO é uma doença cujo braço efetor é principalmente de caráter humoral. Já no caso da EM, a função efetora é de caráter celular, com destaque para a participação dos linfócitos T. A idade média dos pacientes no início do aparecimento dos sintomas também difere, já que na NMO é normalmente mais avançada que naqueles pacientes diagnosticados com EM, que é em média 29 anos (1). Os ataques na EM são normalmente mais amenos e a recuperação dos danos é mais completa, pelo menos na fase inicial da doença (20). Atualmente, as duas doenças são distinguidas por meio de exames da neuroimagem e achados laboratoriais (1, 21, 22, 13, 23). No exame de neuroimagem, as lesões captantes de contraste dos pacientes com NMO se apresentam principalmente no nervo ótico e na medula espinhal na extensão de pelo menos três segmentos de vértebras e não há envolvimento cerebral, pelo menos na fase inicial da doença (24). Na EM, as lesões captantes se apresentam na região periventricular e subcortical do cérebro e as lesões na medula espinhal são normalmente pontuais (7). Durante os ataques, a população de leucócitos infiltrados no líquido céfalo-raquiano (LCR) é diferente nas duas doenças. Na NMO, a concentração de células é mais abundante e predominam as de fenótipo polimorfonuclear. Já na EM, a concentração celular é menor e a população é composta principalmente por células mononucleares (7). A patologia do início da NMO é caracterizada pela fragmentação aguda e perda de astrócitos seguidos por desmielinização. A concentração no LCR da proteína GFAP, marcador de astrócitos, aparece aumentada durante os surtos da NMO. Em contraste, a perda de oligodendrócitos e fragmentação de mielina patológicas parecem ser as primeiras características na EM (20).

As drogas que apresentam algum benefício para o tratamento da EM normalmente não são efetivas para o tratamento da NMO, podendo, em alguns casos, piorar o curso da doença. Enquanto o tratamento da EM é baseado principalmente em imunomoduladores, a NMO é tratada atualmente por imunossuppressores, depleção de células B e plasmaferese. A terapia com os imunossuppressores corticosteróides é comumente utilizada como tratamento inicial para os sintomas da NMO. A manutenção desse tratamento é geralmente a estratégia utilizada e confere reduções nos números de surtos no curso da doença (25). O tratamento por depleção de células B é frequentemente conduzido através da administração do medicamento Rituximab, que se trata de um anticorpo monoclonal quimérico cujo alvo é a proteína CD20 presente nos linfócitos B. Um dos estudos do uso desse medicamento mostrou melhora em 7 de 8 pacientes em suas funções visuais, de bexiga, intestino e nervosa (26). A plasmaferese consiste na depuração extracorpórea do sangue. No caso da NMO, essa técnica tem como objetivo extrair do sangue do paciente os autoanticorpos. Estudos mostram que 50 a 89% dos pacientes com NMO apresentam melhoras significativas após a plasmaferese (27, 28, 29, 30, 31, 32), o que indica a função efetora dos autoanticorpos na doença.

Em 2004, mostrou-se a presença de um anticorpo, inicialmente nomeado de anti-NMO, em 85% dos pacientes com NMO. Esse anticorpo não está normalmente presente nos pacientes de EM (33). Através de técnicas de imunofluorescência indireta, em que o soro do paciente entra em contato com tecido de SNC de camundongos ou de macacos, mostrou-se que o alvo desse anticorpo era um autoantígeno, a aquaporina-4 (34). A aquaporina-4 (AQP4) é o principal canal regulador da homeostase da água no SNC. É um canal transmembrânico formado por 4 subunidades, sendo duas M1 e duas M23.

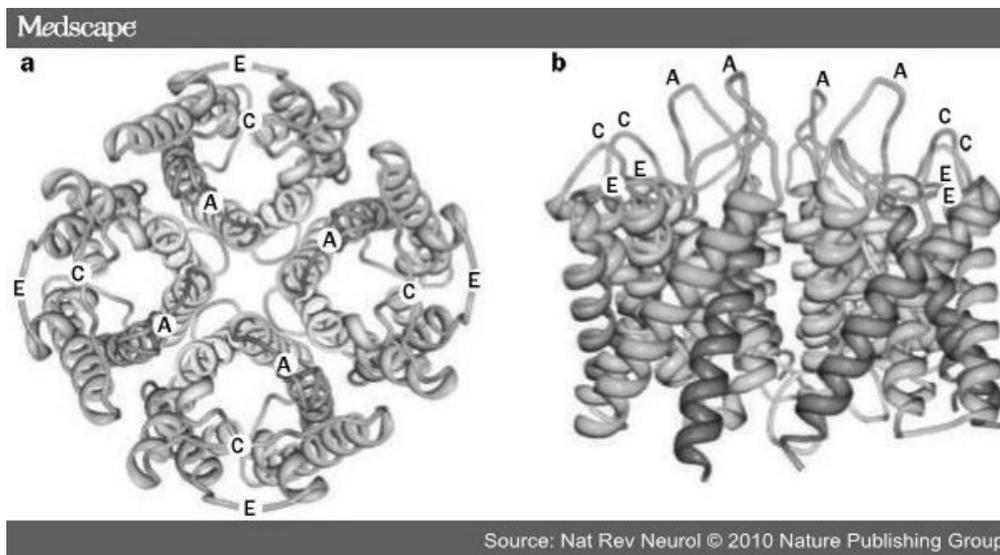


Figura 1. Estrutura quaternária da proteína AQP4.

As sequências de aminoácidos das duas subunidades são equivalentes, porém, a subunidade M1 possui 23 aminoácidos a mais que a subunidade M23 (Fig. 1) (35). O complexo proteico AQP4 está distribuído em alta densidade nos pés dos astrócitos, células que envolvem os vasos sanguíneos do SNC (Barreira hematoencefálica) (BBB) e também axônios (36). A AQP4 é expressa tanto na interface BBB-SNC como na SNC-LCR (36). A AQP4 é encontrada também nas membranas das células endoteliais, mas não aparece nos neurônios, oligodendrócitos ou células epiteliais coroidais. No SNC, acumula-se nos nervos ópticos, tronco encefálico e substância cinzenta da medula espinhal, correlacionando-se com os locais preferidos das lesões (37). A AQP4 é expressa também nos rins, músculos esqueléticos e estômago (38) porém não há evidências de lesões nesses tecidos periféricos em pacientes com NMO, apesar da concentração de anti-AQP4 ser 500 vezes maior no soro quando comparada com a do LCR (34). A expressão e

regulação da AQP4 têm sido estudadas no sentido de entender sua participação em várias condições patológicas, como a NMO (39, 40, 41).

M1

1 MVAFKGVWTQ AFWKAVTAEF LAMLIFVLLS LGSTINWGGT EKPLPVDMVL ISLCFGLSIA
61 TMVQCFGHIS GGHINPAVTV AMVCTRKISI AKSVFYIAAQ CLGAIIGAGI LYLVTPPSVV
121 GGLGVTMVHG NLTAGHGLLV ELIITFQLVF TIFASCDSKR TDVTGSIALA IGFSVAIGHL
181 FAINYTGASM NPARSFGPAV IMGNWENHWI YWVGPIIGAV LAGGLYEYVF CPDVEFKRRF
241 KEAFSKAAQQ TKGSYMEVED NRSQVETDDL ILKPGVVHVI DVDRGEEKKG KDQSGEVLSS
301 VIDVDRGEEK KGKDQSGEVL SSV 323

M23

1 MVAFKGVWTQ AFWKAVTAEF LAMLIFVLLS LGSTINWGGT EKPLPVDMVL ISLCFGLSIA
61 TMVQCFGHIS GGHINPAVTV AMVCTRKISI AKSVFYIAAQ CLGAIIGAGI LYLVTPPSVV
121 GGLGVTMVHG NLTAGHGLLV ELIITFQLVF TIFASCDSKR TDVTGSIALA IGFSVAIGHL
181 FAINYTGASM NPARSFGPAV IMGNWENHWI YWVGPIIGAV LAGGLYEYVF CPDVEFKRRF
241 KEAFSKAAQQ TKGSYMEVED NRSQVETDDL ILKPGVVHVI DVDRGEEKKG KDQSGEVLSS
301 v

Figura 2. Sequência de aminoácidos nas subunidades M1 e M23 da AQP4. As sequências com sublinhado simples se referem às sequências dos loops extracelulares da AQP4. A sequência com sublinhado tracejado se refere aos 23 aminoácidos que estão presentes apenas na sequência da subunidade M1 da AQP4.

Os autoanticorpos anti-AQP4 são detectados em maior porcentagem nos pacientes cuja doença segue o curso de surto e remissão. O anticorpo anti-AQP4 é menos frequentemente observado em pacientes cuja doença segue o curso monofásico (9, 42, 43). Estudos iniciais mostraram que o anticorpo anti-AQP4 foi detectado em apenas 14 de 85000 amostras de pacientes suspeitos de autoimunidade paraneoplásica, sendo que a NMO foi confirmada em 12 dos 14 pacientes positivos para os anticorpos anti-AQP4 (33). Esse autoanticorpo também foi descrito em 12 soros de 19 pacientes diagnosticados

com a forma óptico-espinhal da EM em asiáticos (44). No Brasil, os estudos com NMO e a detecção do anticorpo anti-AQP4 ainda são iniciais, e em trabalho publicado pelo grupo da Universidade de São Paulo, os autores determinaram níveis de anticorpo anti-AQP4 em 64% dos pacientes com NMO, sendo que a casuística foi de 28 pacientes estudados (45). Estudos realizados na Espanha, Reino Unido, França e Turquia, mostraram que o anticorpo anti-AQP4 detectado pelas técnicas de imunofluorescência e imunoprecipitação era 91-100% específico para diferenciar a NMO da EM clássica (46).

Ainda não se sabe exatamente qual é o papel do autoanticorpo anti-AQP4 na doença, se apenas de marcador biológico ou de agente efetor patogênico (47). Existem, entretanto, crescentes evidências que indicam a participação desse autoanticorpo na imunopatogenicidade da doença. A presença de imunoglobulinas e produtos do sistema complemento depositados em vasos sanguíneos no SNC sugerem um papel patogênico para o autoanticorpo da NMO (48). Ainda, o título do anticorpo anti-AQP4 é mais elevado durante os surtos do que nos períodos de remissão e um aumento contínuo nos níveis sorológicos de anti-AQP4, mas não no título de outros anticorpos, é observado em pacientes nos momentos que precedem os ataques clínicos. Também é observado um declínio dos níveis sorológicos de anti-AQP4 nos pacientes em fase de recuperação pós-ataques (49, 50). Além disso, os tratamentos cujos alvos são as células B ou mesmo os próprios autoanticorpos, têm mostrado resultados melhores nos sintomas clínicos dos pacientes (51, 52). Porém, mesmo que esse anticorpo apresente um papel efetor na doença, não se tem conhecimento se a aquaporina-4 é o autoantígeno primário na NMO. Por outro lado, existem pacientes com diagnóstico confirmado de NMO e que não apresentam anticorpos anti-AQP4. É possível que esses pacientes que no momento do

diagnóstico foram classificados como soronegativos, possam ao longo do curso da doença apresentar soropositividade para esse anticorpo, uma vez que já foi demonstrado que o título do anti-AQP4 pode variar durante a evolução clínica da doença (50, 53). No entanto, alguns pacientes soronegativos para anti-AQP4 podem apresentar positividade para outro autoantígeno, como a mielina de oligodendrócito (MOG) que é um dos componentes da mielina do SNC (54).

Dentre as lipoproteínas que constituem a mielina do SNC, encontramos a proteína básica de mielina (MBP), a proteína proteolipídica (PLP), a glicoproteína associada a mielina (MAG), e a MOG (55). MOG é uma glicoproteína expressa principalmente na superfície externa da bainha de mielina de oligodendrócitos e representa 0,05% das proteínas que compõem a mielina no SNC (56). Estudos sugerem o MOG como alvo potencial de autoanticorpos na EM e outras doenças desmielinizantes (9, 55, 57, 58, 59, 60, 61). A atividade desmielinizante em encefalomielite experimental autoimune (EAE) também foi correlacionada a autoimunidade contra o MOG (62). Anticorpos que reconhecem o MOG *in natura*, induzem a desmielinização assim que entram em contato com essa glicoproteína do SNC (63). Um trabalho realizado na Alemanha mostrou que todos os pacientes testados (n=3), diagnosticados com NMO, apresentaram resposta ao MOG por *immunoblotting* e ELISA (64). No trabalho de Kezuka e colaboradores de 2012 (65), 8 pacientes dos 23 diagnosticados com NMO testaram positivos para anti-MOG (35%), sendo que 6 desses 8 também eram anti-AQP4 positivos. Segundo Rostásy e colaboradores (2012) (66) e Kitley J *et al.* (2012) (60), pacientes soropositivos para anti-MOG apresentam evolução clínica mais favorável que aqueles soropositivos para o anti-AQP4. Ainda, a expressão de mRNA do MOG foi testada em diferentes regiões do SNC

e foi encontrada de forma mais abundante no nervo ótico e medula espinhal em relação ao cérebro. A distribuição do MOG, então, poderia estar relacionada, pelo menos em parte, com a localização preferencial das lesões na NMO (67).

Além da análise dos exames de neuroimagem e dos achados laboratoriais, o teste de soropositividade do anticorpo anti-AQP4 pode ser utilizado como exame complementar no diagnóstico da NMO. Atualmente, esse teste é realizado através da técnica de imunofluorescência indireta. A detecção do autoanticorpo anti-AQP4 possibilita o diagnóstico precoce da NMO, antes do aparecimento dos sintomas clínicos mais graves, o que permite o início da terapia apropriada no princípio da doença. Apesar da grande relevância desse teste no diagnóstico da NMO, no Brasil, ele ainda é realizado em poucos estabelecimentos. Do ponto de vista prático, a técnica de imunofluorescência indireta apresenta características desencorajadoras por tratar-se de um procedimento bastante demorado e complexo, com necessidade da utilização de aparelhos com alto custo e mão de obra extremamente especializada. Além disso, a imunofluorescência indireta não é considerada um teste quantitativo e a análise dos resultados pode ser bastante subjetiva, já que depende de um operador humano. Chama a atenção, ainda, que mesmo utilizando-se métodos para a detecção de anticorpos anti-AQP4 sensíveis e específicos, esse anticorpo não é detectado em até 20% dos pacientes que preenchem os critérios clínicos para NMO (68), o que pode indicar problemas no diagnóstico, ou que a sensibilidade dos testes atualmente utilizados seja possivelmente inadequada para quantificar esses autoanticorpos.

Para superar as dificuldades no diagnóstico da NMO, a utilização de um teste de diagnóstico adicional que fosse mais simples, preciso e de baixo custo, como o

teste ELISA seria ideal. ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um teste imunoenzimático que permitiria, no caso do diagnóstico da NMO, a detecção da presença de anticorpo anti-AQP4 no soro de pacientes, a partir da sensibilização da placa com a proteína AQP4, alvo do autoanticorpo da NMO. Entretanto, o mercado somente oferece a proteína AQP4 a um preço extremamente elevado, inviabilizando a montagem de um kit de diagnóstico de rotina. Além disso, a obtenção da AQP4 recombinante poderia ajudar a entender melhor os mecanismos da doença.

A expressão de proteínas recombinantes em sistemas heterólogos é uma das fundações da biotecnologia moderna. As técnicas moleculares de clonagem e expressão de genes heterólogos em diferentes sistemas são alternativas para a produção de antígenos isolados, podendo contribuir na diminuição dos custos de produção dos imunoenaios (69,70).

Dentre os procedimentos de clonagem e expressão de genes codificadores de proteínas, existem diversas possibilidades de sistemas, com hospedeiros procariotos e eucariotos. Para hospedeiros procariotos, existem os sistemas de expressão em bactérias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*). Para hospedeiros eucariotos, existem os sistemas de expressão em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), fungos filamentosos (*Aspergillus*), células vegetais e ainda, células animais. O sistema de expressão em *E. coli* já é extensamente utilizado comercialmente, devido ao vasto conhecimento genético e fisiológico dessa cepa de bactéria, seu rápido crescimento celular, bom rendimento de expressão da proteína a baixo custo, além da grande diversidade de vetores de clonagem e expressão.

Dentre os diversos vetores para expressão proteica heteróloga em *E. coli*, estão os vetores do sistema pET. Nesse sistema, o inserto contendo o gene de interesse é clonado sob o controle transcricional do promotor induzível T7 (71). A expressão é induzida pelo fornecimento de lactose ou Isopropiltiogalactosídeo (IPTG), que ativam a transcrição de uma fonte de RNA polimerase de T7 na célula hospedeira e quando completamente induzida, quase a totalidade dos recursos das células são convertidas para expressar o gene de interesse (72). Outra vantagem são os tags de fusão, presentes no sistema pET, como a cauda de histidina, que auxilia na detecção e purificação da proteína recombinante. Alguns vetores pET também apresentam proteínas de fusão, em que parte do produto da tradução é derivado do inserto e parte do vetor, como o pET28a-GST (87) e o pET SUMO. A ligação proteína recombinante-proteína de fusão confere vantagens na expressão de proteínas recombinantes, como auxiliar na solubilização da proteína de interesse, proteger a proteína recombinante de digestão intracelular, ajudar na conformação e, por consequência, aumentar os níveis de expressão (73). As linhagens escolhidas para nosso objetivo foram as da família de *E. coli* BL21 (DE3). Essa família é específica para a expressão de proteínas heterólogas recombinantes por serem deficientes em proteases do tipo lon e ompT de origem bacteriana, que poderiam degradar as proteínas recombinantes recém-expressas e também serem compatíveis com os vetores do sistema pET por apresentarem o gene da polimerase T7. Além disso, a linhagem BL21 (DE3) pLysS apresenta o plasmídeo pLysS, que contém o gene da lisozima T7, uma proteína bifuncional que digere uma ligação específica do peptidoglicano de parede de *E. coli* e que se liga à RNA polimerase T7 e inibe a expressão de genes sob o controle desta polimerase antes da indução (74).

A expressão de proteínas fora do seu contexto biológico original pode apresentar diversos obstáculos. A maioria das proteínas eucarióticas passam por processos celulares pós-traducionais que nem sempre são reproduzidos em sistemas diferentes. Modificações pós-traducionais são eventos de processamento covalente que mudam as propriedades das proteínas por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos, independente da sequência do gene. Um processo determinante para a funcionalidade de uma proteína recombinante é a conformação tridimensional que ela assume. O enovelamento da proteína, que determina sua conformação, depende do meio celular. O pH, a concentração de sais, a força iônica, a viscosidade da célula na qual o transgene está sendo traduzido pode alterar a sua conformação. Além disto, uma vez enovelada corretamente, a proteína ainda pode ser objeto de modificações pós-traducionais, como a glicosilação, fosforilação, adição de novos grupos funcionais (grupos heme, acetato ou sulfato), cadeias de carboidratos e/ou lipídios. A glicosilação é um processo enzimático complexo que leva a ligação de um polissacarídeo a uma molécula de proteína que ocorre após sua tradução (75). Estima-se que 70% das proteínas humanas existentes são glicosiladas (76). Já a fosforilação consiste na adição de um grupo fosfato (PO_4) a um aminoácido de uma cadeia proteica pela ação de uma quinase. O processo de fosforilação, em geral, está relacionado à ativação ou inibição das funções biológicas de uma proteína. Estima-se que 30% das proteínas humanas apresentem sítios de fosforilação. A ausência dessas etapas na expressão de uma proteína pode comprometer a sua estrutura e funcionalidade (77). No caso da AQP4, a fosforilação em 2 sítios são as únicas modificações pós-traducionais que essa proteína sofre no seu contexto biológico original (78). O sistema de expressão em bactérias é capaz de realizar

a fosforilação após a tradução (88). Desta forma, esse sistema não seria limitante para a expressão da AQP4.

As proteínas de interesse também podem conter códons que são raramente usados pelo sistema de expressão proteica do hospedeiro. O código genético é composto por 61 códons para codificar 20 aminoácidos e 3 códons para terminar a tradução. Cada aminoácido, então, pode ser codificado por um ou mais códons sinônimos. Estes códons são lidos nos ribossomos por tRNAs complementares que carregam o aminoácido apropriado. A redundância do código genético permite que vários tRNAs com códons diferentes codifiquem o mesmo aminoácido. As frequências com os que os diferentes códons são utilizados variam significativamente entre organismos diferentes (79). Desta forma, é preciso, às vezes, ajustar o fornecimento de alguns tRNAs raros para o hospedeiro, para que a expressão da proteína heteróloga seja bem sucedida. No caso do sistema de expressão em *E. coli*, existem algumas maneiras de contornar esse obstáculo. O pRARE é um plasmídeo no qual estão clonados diferentes sequências de tRNAs com códons considerados raros em bactérias, desta forma poderia maximizar a expressão da proteína heteróloga.

Diante do exposto, nesse estudo foi nossa intenção a clonagem e expressão da AQP4 humana em *E. coli* e a detecção de anticorpos anti-MOG no soro de pacientes com diagnóstico de NMO.

2. Objetivos

- Avaliar a presença de anticorpos anti-MOG no soro de pacientes com diagnóstico de NMO.
- Clonar e expressar a proteína AQP4 em sistema bacteriano.
- Desenvolver estratégias para maximizar a expressão e solubilidade da proteína recombinante AQP4.

3. Materiais e Métodos

3.1 Pacientes

Com ajuda do Dr. Felipe von Glehn, neurologista do Hospital das Clínicas da Unicamp, foram recrutados 34 pacientes e 13 controles negativos. Dos 34 pacientes, 15 apresentam forma clínica definida de NMO; 9 estão classificados como mielite transversa extensa; e 10 neurite ótica. Todo material biológico (DNA e soro) dos pacientes e controles se encontram armazenados em nosso laboratório. O estudo teve a aprovação Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Anexo 1) e todos os pacientes aceitaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

3.2 Meios de cultura e estocagem de linhagens e bactérias

Os meios utilizados para cultivos bacterianos foram LB e LB-Ágar (80). Para o preparo do meio LB-Ágar, foram adicionados 15 g/L de Ágar ao meio líquido. Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a pressão relativa de 1 atm, 121° C por 15 minutos. As linhagens bacterianas utilizadas foram estocadas a -80° C em meio LB com 30% de Glicerol.

3.3 Linhagens Bacterianas e preparo de células eletrocompetentes

A linhagem de *E. coli* utilizada para os experimentos de clonagem foi DH10 β . Em adição, as linhagens de *E. coli* utilizadas nos experimentos de expressão de proteína heteróloga foram BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 (81) e BL21 (DE3) pLysS. Nos experimentos de clonagem e expressão foram utilizadas células eletrocompetentes preparadas conforme descrito por Sambrook & Russell, (2001) (80). A linhagem BL21 (DE3) C41 foi gentilmente cedida pelo pesquisador Carlos Roberto Koscky Paier (LnBio), a linhagem BL21 (DE3) C43 foi gentilmente cedida pelo laboratório de Genômica e Expressão (Instituto de Biologia, UNICAMP) e a linhagem BL21 (DE3) pLysS (Promega, USA). Na Tabela 1 estão relacionados os genótipos e as características de cada linhagem.

Tabela 1. Genótipos e características das linhagens de expressão de E. Coli utilizadas.

Linhagens	Genótipo	Características
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) C41	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) e uma mutação não caracterizada	- Deficiente nas proteases lon e ompT. - Lisogênica para o profago λ . - Contém T7 RNA polimerase induzível por IPTG. - Otimizada para expressão de proteínas de membranas.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) C43	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) e duas mutações não caracterizadas	- Mesmas características citadas acima.
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3) pLysS(cm ^R)	- Mesmas características citadas acima. - Plasmídeo pLysS, que produz Lisozima T7, inibidor de expressão basal da T7 polimerase.

3.4 Plasmídeos

Os plasmídeos utilizados neste estudo foram o pDN-LIB-AQP4, que contém o DNA complementar (cDNA) codificador da subunidade M1 da aquaporina-4 humana, obtido junto ao IMAGE clone (# 4717755; Geneservice Ltd, Inglaterra) e utilizado como fonte da sequência de cDNA do gene para AQP4, e os vetores de expressão de proteínas recombinantes, como o plasmídeo pET28a (Novagen, USA), pET28a-GST (87), com a sequência do gene da Glutathione S-transferase clonado (gentilmente cedido pelo pesquisador Carlos Roberto Koscky Paier, do laboratório LnBio (Campinas, Brasil) e o pET SUMO (Invitrogen, USA). O plasmídeo pRARE (Novagen) foi utilizado para otimizar expressão devido a possível presença de códons raros na sequência da AQP4.

3.5 Antibióticos

As linhagens de *E. coli* DH10 β , BL21 (DE3) C41 e BL21 (DE3) C43 não apresentam plasmídeos com resistência intrínseca a antibióticos. Já a linhagem BL21 (DE3) pLysS, apresenta o plasmídeo pLysS que possui resistência ao cloranfenicol. Os plasmídeos pDNR-LIB-AQP4 e pRARE apresentam resistência ao cloranfenicol. Já os plasmídeos pET28a, pET28a-GST e pET SUMO apresentam resistência a canamicina. Desta forma, quando requerido, esses antibióticos foram adicionados ao meio de cultura nas concentrações finais indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de uso dos antibióticos Canamicina e Cloranfenicol.

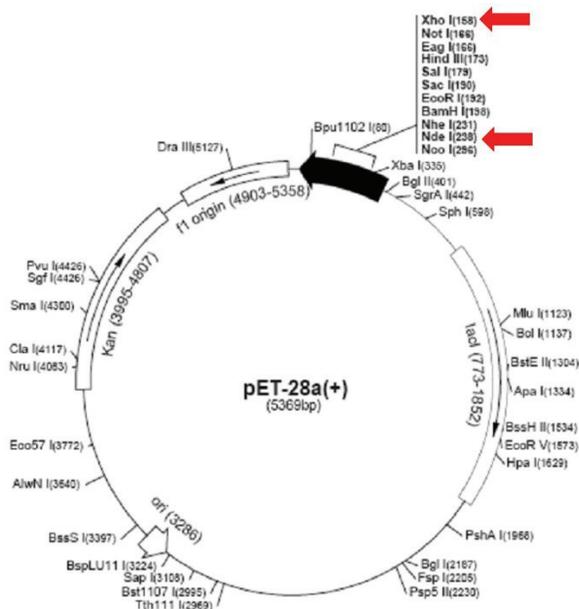
Concentração de uso dos antibióticos	
Canamicina (Can)	50 µg/mL
Cloranfenicol (Clo)	25 µg/mL

3.6 Construção dos clones

Um fragmento de DNA com 900 pares de bases correspondente a sequência codificadora da isoforma M1 da Aquaporina-4 humana (AQP4) foi obtido por meio da técnica de PCR (polimerase chain reaction), a partir do plasmídeo pDNR-LIB-AQP4 e clonado nos vetores de expressão por meio de ligação com T4 DNA Ligase (New England Biolabs, USA) segundo as instruções do fabricante. *E. coli* DH10β eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação, com os produtos de ligação e incubadas em 1 mL de meio LB por 1 hora, a 37° C. As eletroporações em cubetas estéreis de 0,1cm de ranhura seguiram as seguintes condições: 1,8 kV, 25 µF e 200 Ω. Em seguida, as culturas foram plaqueadas em meio sólido (LB-Ágar) com antibióticos nas concentrações apropriadas e incubadas por 16 a 18 horas a 37° C. As colônias isoladas foram submetidas a extração de DNA para detecção de plasmídeos recombinantes por PCR e avaliação do perfil plasmidial após digestão com enzimas de restrição, identificando clones positivos para a clonagem do gene heterólogo.

3.6.1 Construção 1 – pET28a-AQP4

A clonagem do gene da AQP4 foi feita no plasmídeo pET28a (Fig. 2), construindo-se o plasmídeo pET28a-AQP4.



<http://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>

Figura 2. Mapa do plasmídeo pET28a. A sequência de cDNA do gene da AQP4 foi clonado entre os sítios de restrição NdeI e XhoI, assinalados com setas vermelhas.

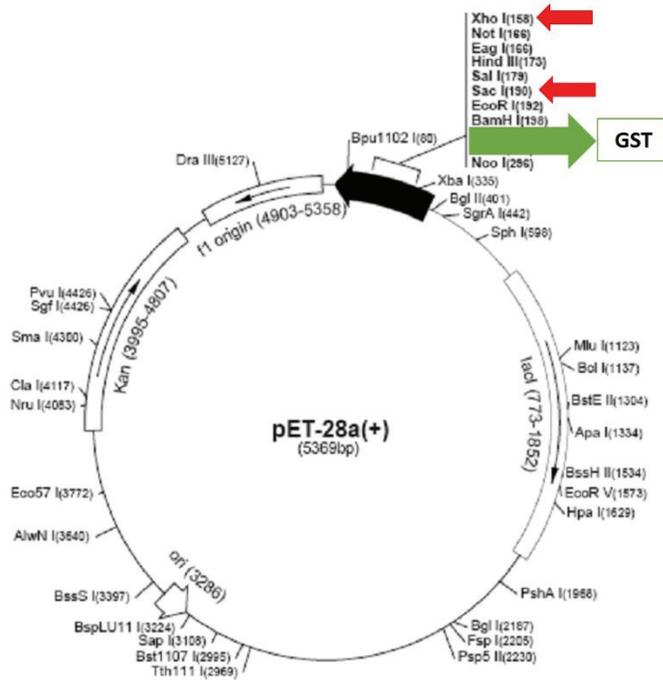
Na construção 1, os *primers* usados para a amplificação da sequência de cDNA do gene da AQP4 estão descritos na Tabela 3. O fragmento amplificado foi clivado com as endonucleases de restrição NdeI e XhoI e clonado no vetor de expressão pET28a (Figura 2), gerando o plasmídeo pET28a-AQP4.

Tabela 3. Primers utilizados para a construção 1.

<i>Primers</i>	Sequências
AQP4NdeIF (forward)	5'-GCGGCCATATGAGTGACAGACCCACAGCAA-3'
AQP4XhoIR (reverse)	5'-GCGGCCTCGAGATACTGAAGACAATACCTCTCCAG-3'

3.6.2 Construção 2 – pET28a-GST-AQP4

A clonagem do gene da AQP4 para a construção 2 foi feita no plasmídeo pET28a-GST (Fig. 3), construindo-se o plasmídeo pET28a-GST-AQP4.



<http://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>

Figura 3. Mapa do plasmídeo pET28a-GST. A seta verde indica a posição do gene da proteína de fusão GST. O inserto da AQP4 foi clonado entre os sítios de restrição SacI e XhoI, assinalados com setas vermelhas.

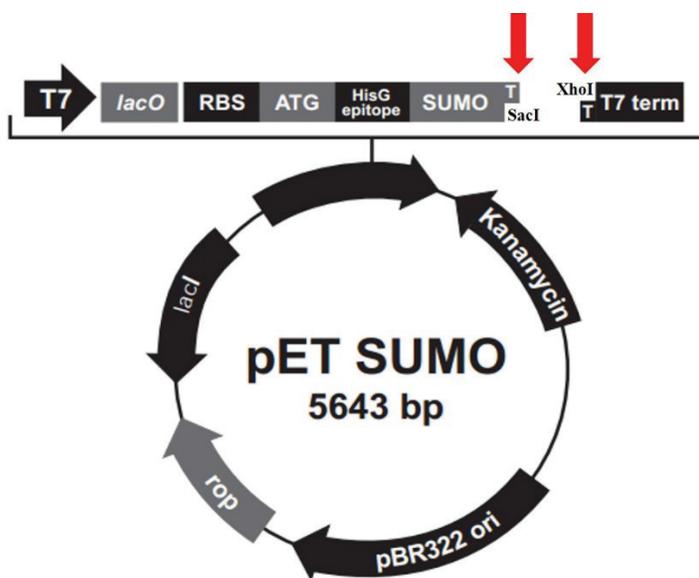
Na construção 2, os *primers* usados para a amplificação da sequência de cDNA do gene da AQP4 estão descritos na Tabela 4. O fragmento amplificado por PCR foi clivado com as endonucleases de restrição SacI e XhoI e clonado no vetor de expressão pET28a-GST (Figura 3), gerando o plasmídeo pET28a-GST-AQP4.

Tabela 4. Primers utilizados para a construção 2.

Primers	Sequências
AQP4SacIF (forward)	5'-GCGGCGAGCTCATGAGTGACAGACCCACAG-3'
AQP4XhoIR (reverse)	5'-GCGGCCTCGAGATACTGAAGACAATACCTCTCCAG-3'

3.6.3 Construção 3 – pET SUMO-AQP4

A clonagem do gene da AQP4 para a construção 3 foi feita no plasmídeo pET SUMO (Fig. 4).



<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/K30001>

Figura 4. Mapa do plasmídeo pET SUMO. A sequência de cDNA do gene da AQP4 foi clonado entre os sítios de restrição SacI e XhoI, assinalados com setas vermelhas.

Na construção 3, os *primers* usados estão descritos na Tabela 5. O fragmento amplificado por PCR foi clivado com as endonucleases de restrição SacI e XhoI e

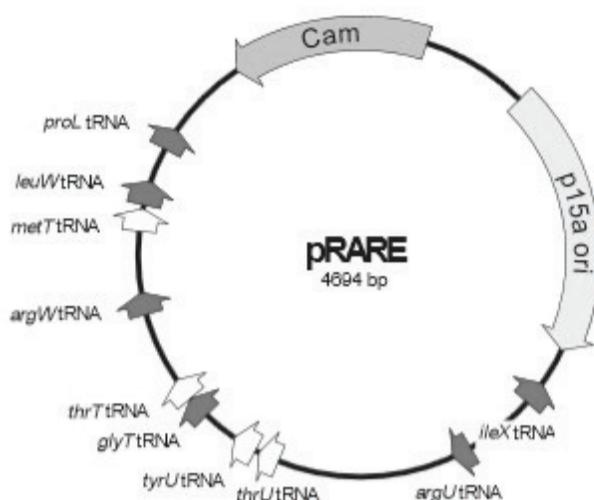
clonado no vetor de expressão pET SUMO (Figura 4), originando o plasmídeo pET SUMO-AQP4.

Tabela 5. Primers utilizados para a construção 3.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
AQP4SacIF (forward)	5'-GCGGCGAGCTCATGAGTGACAGACCCACAG-3'
AQP4XhoIR (reverse)	5'-GCGGCCTCGAGATACTGAAGACAATACCTCTCCAG-3'

3.7 Construção das linhagens de expressão

Os plasmídeos construídos foram extraídos e purificados utilizando-se o Kit Illustra Minispin (GE Healthcare, USA). As linhagens de expressão *E. coli* BL21 (DE3) C41, *E. coli* BL21 (DE3) C43 e *E. coli* BL21 (DE3) pLysS eletrocompetentes foram transformadas por eletroporação com os plasmídeos pET28a-AQP4, pET28a-GST-AQP4 e pET SUMO-AQP4 e incubadas em 1 mL de meio LB por 1 hora, a 37° C sob agitação. Em seguida, foram plaqueadas em meio sólido LB-Ágar com os antibióticos específicos para cada linhagem e plasmídeo. O plasmídeo pRARE (Fig. 5) foi eletroporado juntamente com os demais plasmídeos construídos.



<http://www.protocol-online.org/forums/index.php?app=forums&module=forums§ion=printtopic&client=printer&f=42&t=19918>

Figura 5. Mapa do plasmídeo pRARE. Plasmídeo no qual estão clonados diferentes sequências de tRNAs com códons considerados raros em bactérias.

3.8 Indução da expressão de proteínas heterólogas por IPTG

Colônias transformantes foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo o antibiótico necessário para cada linhagem e cultivadas por 16-18 horas a 37° C sob agitação (150 rpm). Uma alíquota de 500 µl dessa cultura saturada foi repassada para 50 mL de meio LB com antibiótico para posterior crescimento a 37° C sob agitação constante (150 rpm). Ao atingir a densidade ótica à 600 nm (DO₆₀₀ igual a 0,6), uma alíquota de 2 mL foi retirada para servir como controle préindução e ao restante foram adicionados 500 µl de IPTG (1 mM) para a indução da expressão da proteína recombinante. A adição de IPTG induz a expressão dos genes regulados pelo promotor T7. A cultura induzida foi incubada a 37° C por mais quatro horas sob agitação constante

(150 rpm). A alíquota préindução e o restante da cultura induzidas foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de tampão de extração 2x (Tris-HCl 200 mM pH 8,0; DTT 4 mM; PMSF 4 mM; NaCl 600 mM) gelado. Lisozima (150 µg/mL de extrato) e DNase (10 unidades) foram acrescentadas. O volume foi completado para 2,0 mL com Água Ultra-Pura (Gibco, USA) e mantido em banho de gelo por 45 minutos. Em seguida, cada alíquota foi sonicada em 3 pulsos de 10 segundos com 70% de amplitude no sonicador Cole Parmer (USA) e então, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos à 4° C, separando-se assim a porção solúvel da insolúvel. O sobrenadante foi armazenado contendo a fração solúvel das proteínas totais e o precipitado insolúvel foi ressuspenso em 2,0 mL de tampão de uréia (Tris-HCl 10mM pH 8,8, NaH₂PO₄ 100 mM; Ureia 8 M). Todas as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford.

3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil proteico dos clones obtidos foram visualizados por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12 % (80).

As amostras foram diluídas 1:1 em tampão de corrida (Sigma-Aldrich, USA) e passaram por banho seco de 5 minutos a 95° C. Cada amostra diluída foram aplicados nos poços do gel e foram submetidas a voltagem de 100 V durante 2 horas aproximadamente.

3.9.1 Coloração por *Coomassie Brilliant Blue*

O corante *Coomassie Brilliant Blue* realiza uma interação eletrostática com os grupamentos amino das proteínas e peptídeos, permitindo a observação de produto proteico no gel (82).

O gel foi retirado do aparato de eletroforese e submerso por 30 minutos em solução corante de *Coomassie Brilliant Blue* 250-R (Bio-Rad, USA) conforme descrito em Sambrook e Russel (2001) (80). Para inferir a massa molecular das bandas proteicas foi utilizado o marcador de peso molecular para proteínas *Protein standard broad range* (Bio-rad, USA). A descoloração dos géis para visualização das bandas foi efetuada com a solução descorante (80).

3.9.2 Western-blot

Após a corrida de eletroforese, as bandas proteicas foram transferidas para membranas de nitrocelulose para a identificação da proteína recombinante por Western-blot. Para isso, o gel de SDS-PAGE foi colocado no sistema de transferência (Bio-Rad, USA) em contato com uma membrana de nitrocelulose (Hybond™ C extra membrane, GE Healthcare, USA), entre papéis filtro (Whatman, USA). O sistema foi colocado em uma cuba de transferência Trans-Blot (Bio-Rad, USA), imerso em tampão de transferência (80). A eletrotransferência foi realizada a 45 V por 2 horas. Após a transferência, as possíveis interações inespecíficas foram bloqueadas com solução de bloqueio composta por 0,05% de leite em pó semidesnatado em TBS (50 mM Tris-HCl

pH 7,6; 150 mM NaCl) durante a noite à 4° C. Após o bloqueio, a membrana passou por 3 lavagens de 5 minutos cada com TBS-TWEEN20 (0,05%) (TBST) e 3 lavagens de 5 minutos cada com TBS. Após as lavagens, a membrana contendo as proteínas foi incubada com soro policlonal anti-AQP4 de camundongo (AbD Serotec, USA) por 2 horas a 37° C, sob agitação leve. A membrana, após passar pelo mesmo processo de lavagem supracitado, foi incubada com soro anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) na diluição 1:2000, por 2 horas a 37° C, sob agitação constante. Para a detecção da proteína recombinante, a membrana foi novamente lavada com TBST e TBS e colocada em contato com uma solução contendo 1 comprimido de dietil-amino-etil-benzidina (FAST DAB - Sigma-Aldrich, USA) diluído em 15 mL de TBS e 12 µl de peróxido de hidrogênio a cada alíquota de 5 mL do DAB diluído. Para interrupção da reação enzimática, a membrana foi lavada com água destilada. A documentação fotográfica foi feita em fotodocumentador (Carestream Kodak, USA).

3.10 Ensaio para detecção de anti-AQP4

Para pesquisa de anticorpos anti-AQP4 no soro dos pacientes com Distúrbios do Espectro da Neuromielite Óptica (DENMO) foi usado o kit de imunofluorescência indireta em células HEK293 transfectadas com o gene da subunidade M1 da AQP4 humana (Euroimmun AG, Alemanha), método mais sensível (70%) e específico (100%) disponível atualmente no mercado internacional (68).

Nesse kit, lâminas de vidro ativadas fisicamente ou quimicamente são cobertas com cultura de células HEK293, divididas em dois campos, um com transfecção da

AQP4 humana e o outro sem transfecção, a fim de criar um controle negativo por teste realizado. Após diluição 1:10 das amostras de soro com PBS-TWEEN20 (0,1%) (PBST), 25µL da solução foram aplicados em cada campo da lâmina de vidro, evitando bolhas de ar, e incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos. Após incubação, as lâminas foram lavadas com PBST por 5 minutos sob agitação conforme orientações do fabricante. Para revelação dos anticorpos anti-AQP4, foram utilizados 20µL do anticorpo anti-IgG humano conjugado com fluoresceína, aplicados sobre campos de reação. Após novo período de incubação de 60 minutos em temperatura ambiente e sob proteção da luz, as lâminas de vidro foram lavadas novamente com PBST durante 5 minutos, sob agitação, devidamente secadas, e preparadas para leitura no microscópio de fluorescência (Zeiss Observer Z1 Microscope, Germany). Os resultados foram considerados válidos quando o campo sem transfecção veio negativo para fluorescência. Quando o campo com transfecção de AQP4 demonstrava fluorescência na superfície das células e com padrão semelhante ao encontrado no controle positivo fornecido pelo kit, o resultado foi considerado positivo para o anticorpo anti-AQP4. Quando existia ausência de fluorescência no campo com transfecção, o resultado foi considerado negativo para o anticorpo anti-AQP4.

3.11 ELISA

Para a detecção de anticorpos anti-MOG no soro dos pacientes de NMO, foi utilizada a técnica de imunoensaio ELISA. Para isso, placas de ELISA foram sensibilizadas com o peptídeo MOG 1-126 (Interprise, USA) (5µg/ml) durante a noite.

Após lavagem com PBST, as placas seguiram para a etapa de bloqueio, com BSA diluído em PBS a 2%, por 2 horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio e etapa de lavagem, o soro dos pacientes foi adicionado e incubado por 2 horas a temperatura ambiente (Diluições de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1600). Então, 1 µg/mL do anticorpo secundário de detecção - IgG humana (Sigma-Aldrich, USA) diluído a 1:10000 foi adicionado seguido pelo substrato da peroxidase. A densidade ótica foi determinada a 492 nm (Leitora de ELISA Labsystems, USA). Para evitar variação dos resultados, todas as amostras foram testadas no mesmo momento. O resultado da D.O. de cada paciente ou indivíduo controle foi transformado em Log10 do título da anticorpo. Assim, o título dos indivíduos controles na menor diluição foi considerado o título máximo para que um resultado fosse considerado negativo.

4. Resultados

4.1 Pacientes

Os pacientes recrutados com a ajuda do Dr. Felipe von Glehn foram analisados pela idade, sexo, tempo desde o primeiro ataque, número de relapsos, Escala expandida de status de desabilidade (EDSS) e também pela presença de anti-AQP4 no soro. Esses dados demográficos e clínicos dos pacientes estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Características clínicas e demográficas dos pacientes diagnosticados.

	NO	NMO	LETM
Número de pacientes	10	15	9
Média de idade	29 (16-49)	42 (17-63)	49 (14-76)
Sexo F/M	7/3	14/1	6/3
Média do tempo desde o primeiro ataque (em anos)	5 (0,9-19)	6 (2-19)	1 (0,9-3)
Média do número de relapsos	3 (1-15)	5 (3-15)	2 (1-3)
Média de EDSS	4 (1-8,5)	5 (2-8,5)	2,5 (1-7)
% de anti-AQP4+	2/10 (20%)	13/15 (87%)	4/9 (44%)

NO = Neurite ótica, LETM = Mielite transversa extensa, EDSS = Escala expandida de status de desabilidade.

4.2 Ensaio de Imunofluorescência para detecção de anti- aquaporina-4

Atualmente, o ensaio para a verificação da presença de anticorpos anti-aquaporina-4 é realizado através de imunofluorescência indireta em células previamente transduzidas com aquaporina-4 (Fig. 6). Os ensaios demonstraram que dos pacientes com forma clínica definida de NMO, 87% apresentaram anticorpos anti-AQP4; dos pacientes com a forma de mielite transversa extensa 44% e dos pacientes com neurite ótica 20% apresentaram o anticorpo. Porém, alguns pacientes apresentaram o teste inconclusivo, apresentando uma marcação fraca, como mostra a figura 6 (C). Pelo protocolo do teste, esses pacientes são considerados negativos. Entretanto, é difícil dizer se a marcação fraca é resultado de *background* ou devido baixa titulação de anticorpos no soro desses pacientes naquele momento.

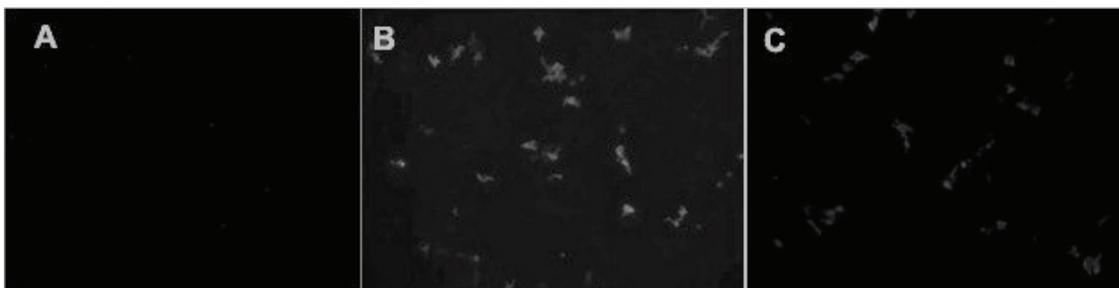


Figura 6. Teste de imunofluorescência de pacientes com suspeita de NMO. (A) Paciente com teste de imunofluorescência negativo, (B) Paciente com teste de imunofluorescência positivo, (C) Paciente com teste de imunofluorescência inconclusivo.

As mesmas características clínicas e demográficas apresentadas na Tabela 5 foram verificadas nos pacientes após a detecção do anticorpo anti-AQP4 e apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Características clínicas e demográficas dos pacientes em relação a presença ou ausência do anticorpo anti-AQP4.

	Anti-AQP4 +	Anti-AQP4 -
Número de pacientes	19	15
Média de idade	40 (14-63)	39 (16-76)
Sexo F/M	17/2	11/4
Média do tempo desde o primeiro ataque (em anos)	5 (1-19)	2 (1-9)
Média do número de surtos	4 (2-15)	3 (1-6,5)
Média de EDSS	4,5 (1,5-8,5)	5 (2-8,5)

EDSS = Escala expandida de status de desabilidade.

4.3 Construção 1 – pET28a-AQP4

A Figura 7 mostra a eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação do fragmento da AQP4 realizada por PCR, a partir do plasmídeo pDNR-LIB contendo a sequência do gene da subunidade M1 da AQP4. A amplificação obteve êxito nas temperaturas de anelamento de 52° C, 54° C, 56° C e 58° C, com os *primers* AQP4NdeIF e AQP4XhoIR. Durante a amplificação, foram adicionados ao inserto os sítios de restrição correspondentes às enzimas XhoI e NdeI, o que, após ação das enzimas de restrição, tornou o inserto compatível para a clonagem *in frame* no vetor pET28a. O resultado da clonagem do fragmento de 900 pb (AQP4) com o vetor de expressão pET28a de 5,4 kb é de um plasmídeo pET28a-AQP4, com 6,3 kb. Essa primeira construção foi linearizada por digestão simples com a enzima de restrição XhoI e é mostrada na Figura 8.

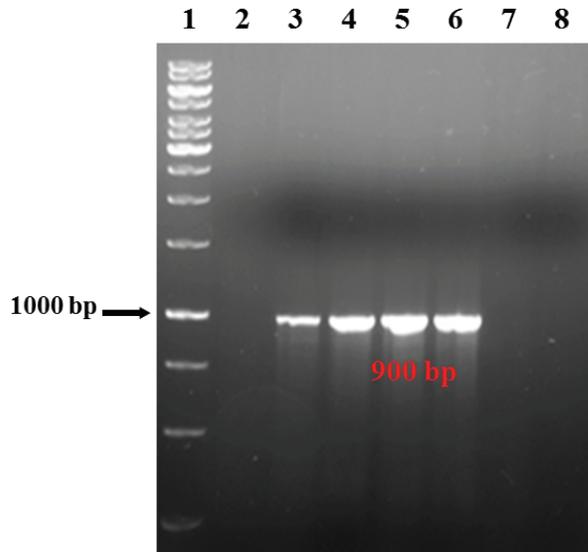


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) do produto da amplificação do inserto AQP4 utilizando os *primers* AQP4NdeIF e AQP4XhoIR. (1) Marcador molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas), (2) Amplificação da AQP4 na temperatura 50° C (negativa), (3) Amplificação da AQP4 na temperatura 52° C onde é possível visualizar o fragmento de DNA de 900 pb, (4) Amplificação da AQP4 na temperatura 54° C com fragmento de 900 pb, (5) Amplificação da AQP4 na temperatura 56° C (900 pb), (6) Amplificação da AQP4 na temperatura 58° C (900 pb), (7) Amplificação da AQP4 na temperatura 60° C (negativa) e (8) Amplificação do controle negativo do PCR na temperatura 56° C em que DNA = água milliQ.

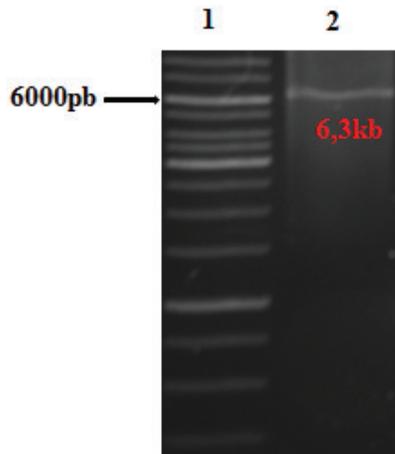


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) do produto da clonagem do vetor pET28a com o inserto AQP4, linearizado. (1) Marcador molecular *GeneRuler* 1 kb DNA Ladder (Fermentas), (2) Construção 1 (pET28a-AQP4) linearizada com 6,3 kb.

O plasmídeo resultante da clonagem, pET28a-AQP4, foi então submetido a nova reação de PCR, com os mesmos *primers* da amplificação do inserto (AQP4NdeIF e AQP4XhoIR), para confirmar a presença do gene da AQP4 na construção. Utilizando uma temperatura de anelamento de 56° C na reação de PCR, a figura 9 mostra a confirmação da presença do inserto na construção 1.

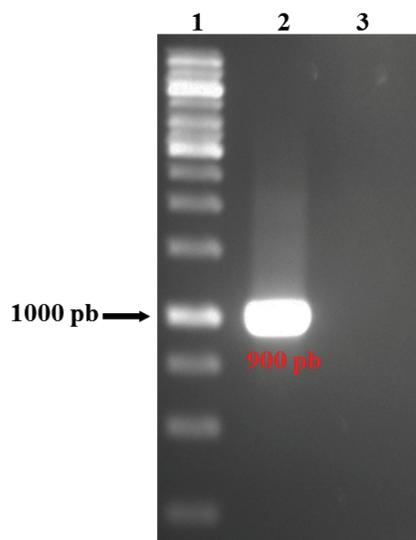


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) da confirmação da clonagem pET28a-AQP4 por PCR. (1) Marcador molecular *GeneRuler* 1 kb DNA Ladder (Fermentas), (2) Amplificação do inserto AQP4 na temperatura 56° C com 900 pb. (3) Amplificação do controle negativo do PCR na temperatura 56° C em que DNA = água milliQ.

Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo pET28a contendo o gene da AQP4 foi utilizado para eletroporar linhagens de *E. coli* para expressão de proteínas recombinantes, sendo os clones obtidos submetidos a indução de expressão de AQP4 com IPTG. Após a indução, o conteúdo total das proteínas produzidas por linhagem foi quantificado pelo método de Bradford. O resultado da quantificação proteica resultante das induções de expressão das linhagens BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS estão apresentadas a seguir.

A Tabela 8 mostra as concentrações proteicas expressas pelo vetor da construção 1 (pET28a-AQP4), porções solúvel e insolúvel, nas linhagem BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS nos momentos préindução e pós-indução. Ainda, a

Tabela 8 também apresenta a razão dos valores pré e pós induzidos, mostrando quantas vezes a concentração proteica aumentou após a introdução do IPTG. A figura 10 mostra o gráfico que representa o aumento das concentrações totais de proteína.

Tabela 8. Tabela do resultado da indução da expressão do vetor da construção 1 (pET28a-AQP4) nas diferentes linhagens de expressão.

	Préindução (ug/mL)	Pós-indução (ug/mL)	Razão Pós/Pré
C41 pET28a-AQP4 sol	2,05	4,5	2,2
C41 pET28a-AQP4 insol	1,2	3,2	2,7
C43 pET28a-AQP4 sol	0,8	5,95	7,4
C43 pET28a-AQP4 insol	2,95	3,15	1,1
pLysS pET28a-AQP4 sol	0,95	4,85	5,1
pLysS pET28a-AQP4 insol	0,05	1,2	24,0

Sol = porção solúvel, insol = porção insolúvel.

Induções da construção 1 - pET28a-AQP4

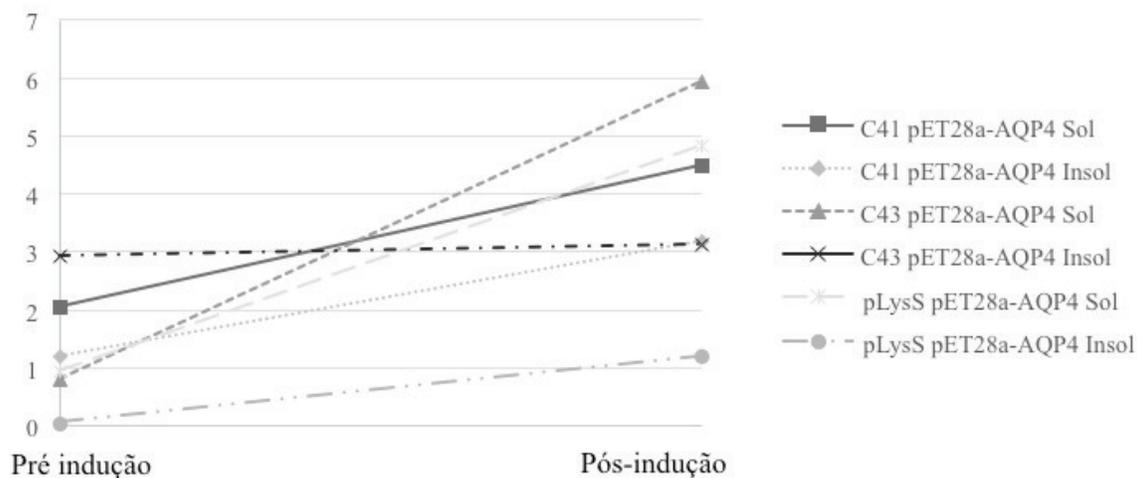


Figura 10. Gráfico demonstrativo das concentrações das proteínas totais da construção 1 (pET28a-AQP4) nas linhagens BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS nos momentos pré e pós-indução.

O extrato de proteínas totais foi, então, submetido à separação eletroforética por SDS-PAGE, com o intuito de determinar se a indução da expressão dos genes sob o controle do promotor T7 havia sido bem-sucedida. As Figuras 11, 12 e 13 mostram a separação por peso molecular do conteúdo total das proteínas resultantes das induções de expressão do plasmídeo pET28a-AQP4 nos momentos pré e pós-indução das 3 linhagens de expressão empregadas nesse trabalho e indicam o sucesso das induções proteicas. Foram aplicados 30 µL de amostra em cada poço. Os valores em µg de proteína aplicados nos géis de SDS-PAGE estão indicados nas Tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9. Valores em µg de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem C41 pET28a-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
C41 pET28a-AQP4 sol	0,062	0,135
C41 pET28a-AQP4 insol	0,036	0,096

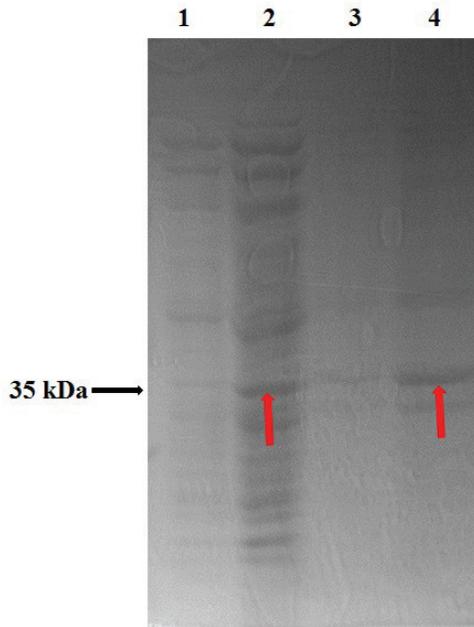


Figura 11. Gel SDS-Page do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C41 contendo o plasmídeo pET28a-AQP4, corado com Coomassie Brilliant Blue. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução. As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r, com 35 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

Tabela 10. Valores em µg de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem C43 pET28a-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
C43 pET28a-AQP4 sol	0,024	0,179
C43 pET28a-AQP4 insol	0,089	0,095

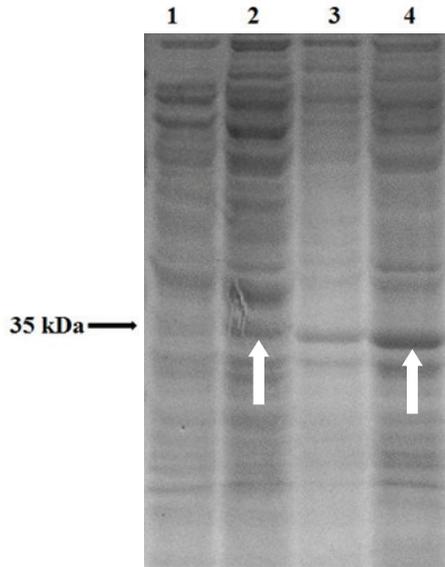


Figura 12. Gel SDS-Page do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C43 contendo o plasmídeo pET28a-AQP4, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução. As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r, com 35 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

Tabela 11. Valores em μg de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem pLysS pET28a-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
pLysS pET28a-AQP4 sol	0,029	0,146
pLysS pET28a-AQP4 insol	0,002	0,036

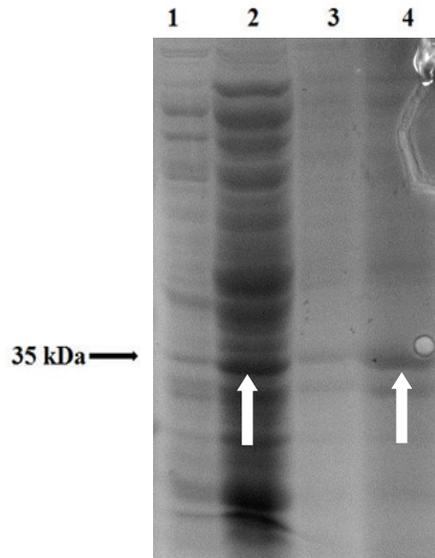


Figura 13. Gel SDS-PAGE do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET28a-AQP4, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução. As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r, com 35 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

A técnica de western blot foi então utilizada para verificar se o resultado apresentado no gel de SDS-PAGE correspondia ao sucesso na expressão específica da AQP4r pelo plasmídeo pET28a-AQP4. Utilizando o anticorpo anti-AQP4 foi possível demonstrar que houve expressão da proteína recombinante de interesse, como mostra a Figura 14. Foram aplicados 80 μ L do conteúdo total das proteínas resultantes das induções. Os valores em μ g de proteína aplicados no gel para Western blot estão indicados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores em µg de proteína aplicados em cada poço do gel para Western blot da linhagem C41 pET28a-AQP4.

	Pré-indução (ug)	Pós-indução (ug)
C41 pET28a-AQP4 sol	0,164	0,36
C41 pET28a-AQP4 insol	0,096	0,256

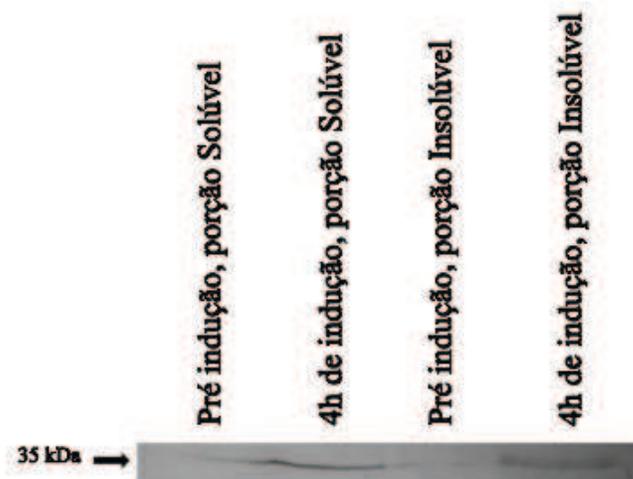


Figura 14. Western blot da confirmação da expressão da proteína AQP4 na linhagem C41 com pET28a-AQP4. As frações pós-indução apresentam banda na altura esperada para a proteína recombinante AQP4.

4.4 Construção 2 - pET28a-GST-AQP4

A Figura 15 mostra a eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação do inserto da AQP4 realizada por PCR, a partir do plasmídeo pDNR-LIB contendo a sequência do gene da subunidade M1 da AQP4. A amplificação obteve êxito nas temperaturas de anelamento de 54° C, 56° C e 58° C, com os *primers* AQP4SacIF e AQP4XhoIR. Durante a amplificação, foram adicionados ao inserto os sítios de restrição

correspondentes às enzimas XhoI e SacI, o que, após ação das enzimas de restrição, tornou o inserto compatível com o vetor pET28a-GST para a ligação. O resultado da clonagem do fragmento de 900 pb (AQP4) com o vetor de expressão pET28a-GST de 5,9 é de um plasmídeo pET28a-GST-AQP4, com 6,8 kb. Essa segunda construção foi linearizada por digestão simples com a enzima de restrição XhoI e é mostrada na Figura 16.

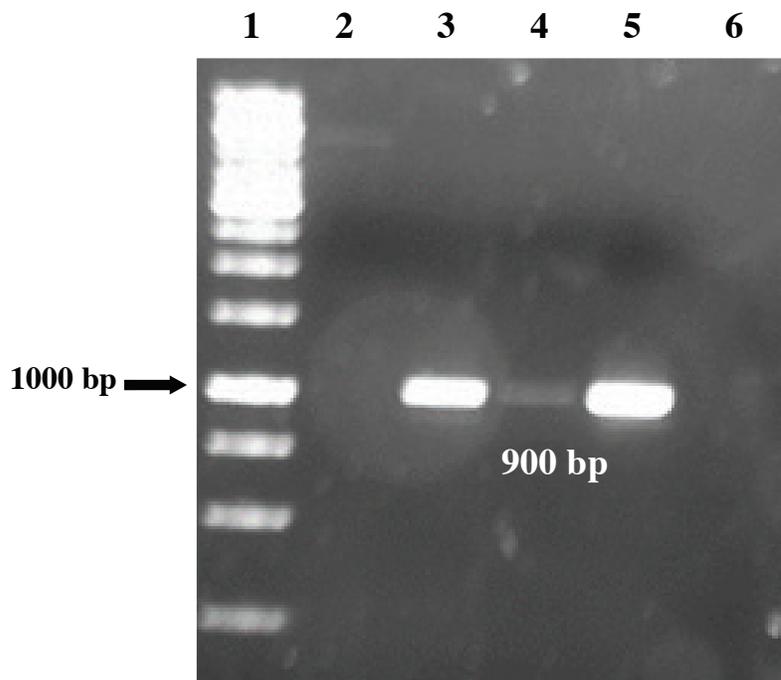


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) do produto da amplificação do inserto AQP4 para os primers AQP4SacIF e AQP4XhoIR. (1) Marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas), (2) Amplificação da AQP4 na temperatura 52° C com 900 pb (negativa), (3) Amplificação da AQP4 na temperatura 54° C com 900 pb, (4) Amplificação da AQP4 na temperatura 56° C com 900 pb, (5) Amplificação da AQP4 na temperatura 58° C com 900 pb e (6) Amplificação do controle negativo do PCR na temperatura 54° C em que DNA = água milliQ.

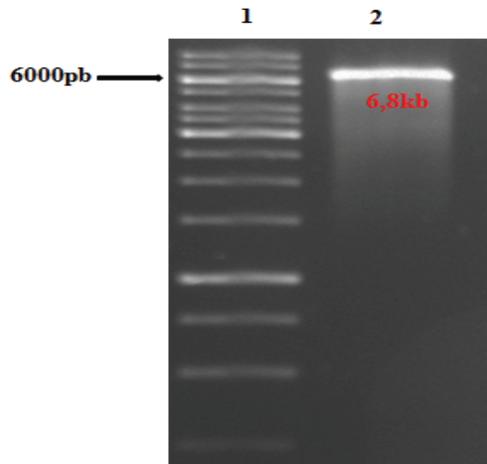


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) do produto da clonagem do vetor pET28a-GST com o inserto AQP4, linearizado. (1) Marcador molecular *GeneRuler 1 kb* DNA Ladder (Fermentas), (2) Construção 2 (pET28a-GST-AQP4) linearizada com 6,8 kb.

O plasmídeo resultante da clonagem, pET28a-GST-AQP4, foi então submetido a nova reação de PCR, com os *primers* da amplificação do inserto (AQP4SacIF e AQP4XhoIR), para confirmar a presença do gene da AQP4 na construção. Utilizando uma temperatura de anelamento de 58° C na reação de PCR, a figura 17 mostra a confirmação da presença do inserto na construção 2.

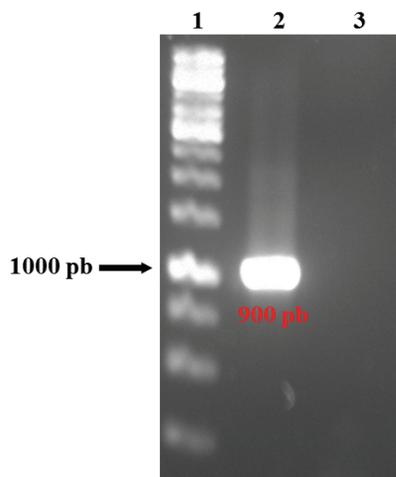


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) da confirmação da clonagem pET28a-GST-AQP4 por PCR. (1) Marcador molecular *GeneRuler* 1 kb DNA Ladder (Fermentas), (2) Amplificação do inserto AQP4 na temperatura 58° C com 900 pb e (3) Amplificação do controle negativo do PCR na temperatura 58° C em que DNA = água milliQ.

Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo pET28a-GST contendo o gene da AQP4 foi utilizado para eletroporar linhagens de *E. coli* para expressão da proteína recombinante. Após a indução da expressão com IPTG, o conteúdo total das proteínas produzidas por linhagem foi quantificado pelo método de Bradford. O resultado da quantificação proteica resultante das induções de expressão das linhagens BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS estão apresentadas a seguir.

A Tabela 13 mostra as concentrações proteicas expressas pelo vetor da construção 2 (pET28a-GST-AQP4), porções solúvel e insolúvel, nas linhagem BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS nos momentos préindução e pós-indução. Ainda, a Tabela 13 também apresenta a razão dos valores pré e pós induzidos, mostrando

quantas vezes a concentração proteica aumentou após a introdução do IPTG. A Figura 18 mostra o gráfico que representa o aumento das concentrações totais de proteína.

Tabela 13. Tabela do resultado da indução da expressão do vetor da construção 2 (pET28a-GST-AQP4) nas diferentes linhagens de expressão.

	Préindução (ug/mL)	Pós-indução (ug/mL)	Razão Pós/Pré
C41 pET28a-GST-AQP4 sol	2,4	15,5	6,5
C41 pET28a-GST-AQP4 insol	0,05	1,05	21,0
C43 pET28a-GST-AQP4 sol	1,65	3,3	2,0
C43 pET28a-GST-AQP4 insol	0,75	4,8	6,4
pLysS pET28a-GST-AQP4 sol	1,35	5,8	4,3
pLysS pET28a-GST-AQP4 insol	0,25	1,3	5,2

Sol = porção solúvel, insol = porção insolúvel.

Induções da construção 2 - pET28a-GST-AQP4

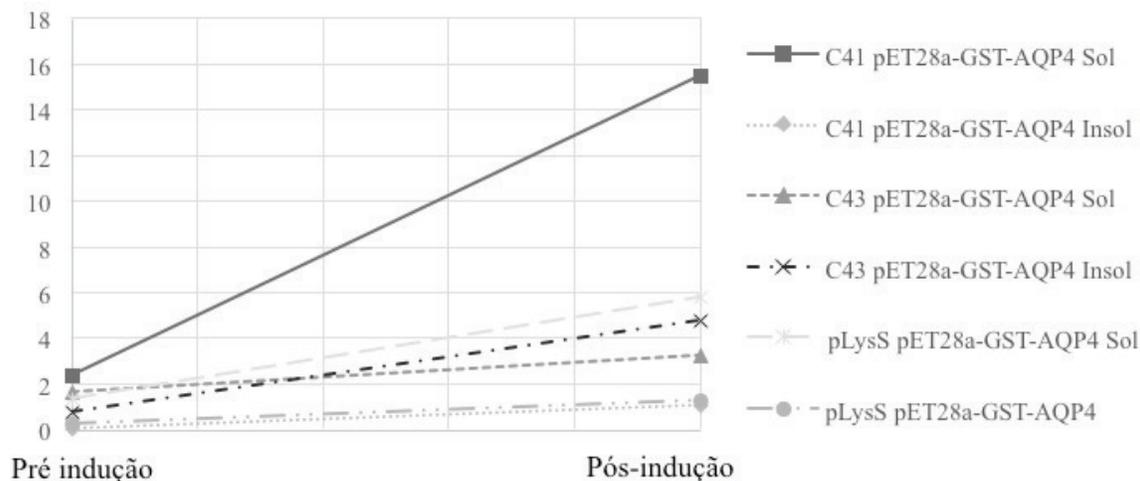


Figura 18. Gráfico demonstrativo das concentrações das proteínas totais da construção 2 (pET28a-GST-AQP4) nas linhagens BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS nos momentos pré e pós-indução.

O extrato de proteínas totais foi, então, submetido à separação eletroforética por SDS-PAGE, com o intuito de determinar se a indução da expressão dos genes sob o controle do promotor T7 havia sido bem-sucedida. As Figuras 19, 20 e 21 mostram a separação por peso molecular do conteúdo total das proteínas resultantes das 3 linhagens bacterianas utilizadas neste estudo contendo o plasmídeo pET28a-GST-AQP4 nos momentos pré e pós-indução da expressão por IPTG e sugerem o sucesso das induções da proteína AQP4r ligada ao GST, com 60 kDa. Foram aplicados 30 µL de amostra em cada poço. Os valores em µg de proteína aplicados nos géis de SDS-PAGE estão indicados nas Tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14. Valores em μg de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem C41 pET28a-GST-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
C41 pET28a-GST-AQP4 sol	0,072	0,465
C41 pET28a-GST-AQP4 insol	0,002	0,032

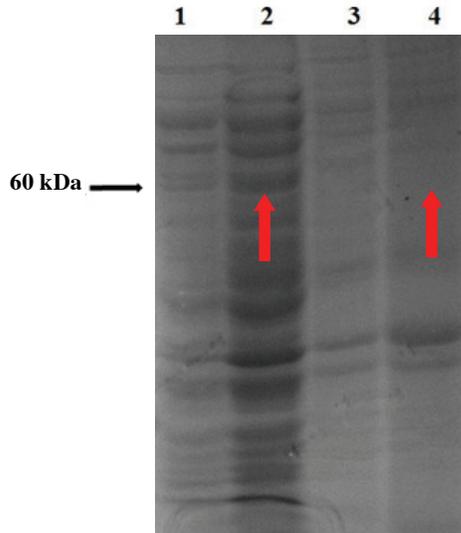


Figura 19. Gel SDS-Page do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C41 contendo o plasmídeo pET28a-GST-AQP4, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução (negativo). As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r ligada ao GST, com 60 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

Tabela 15. Valores em μg de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem C43 pET28a-GST-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
C43 pET28a-GST-AQP4 sol	0,050	0,099
C43 pET28a-GST-AQP4 insol	0,023	0,144

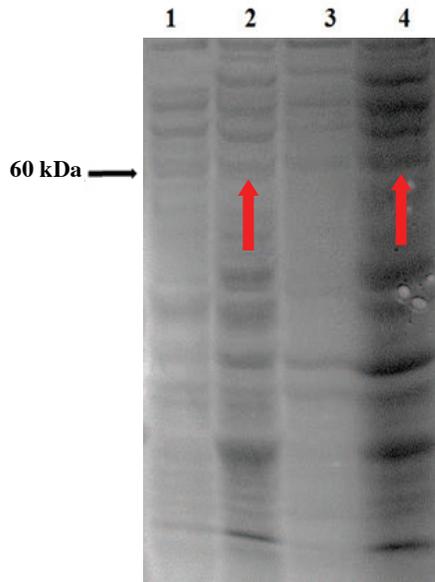


Figura 20. Gel SDS-Page do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C43 contendo o plasmídeo pET28a-GST-AQP4, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução. As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r ligada ao GST, com 60 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

Tabela 16. Valores em μg de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem pLysS pET28a-GST-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
pLysS pET28a-GST-AQP4 sol	0,041	0,174
pLysS pET28a-GST-AQP4 insol	0,008	0,039

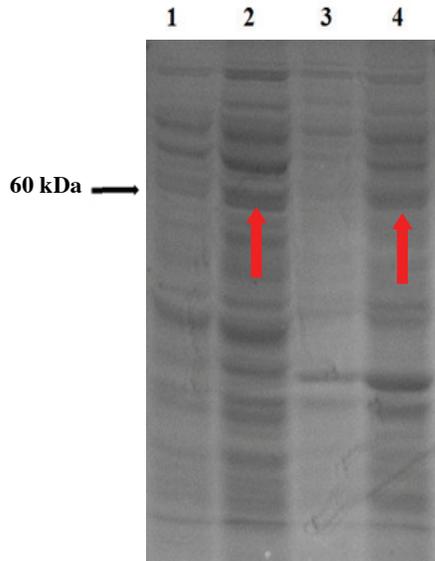


Figura 21. Gel SDS-Page do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET28a-GST-AQP4, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução. As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r ligada ao GST, com 60 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

A técnica de Western blot foi utilizada então para verificar se o resultado apresentado no gel de SDS-PAGE correspondia ao sucesso na expressão específica da AQP4r pelo plasmídeo pET28a-GST-AQP4. Utilizando o anticorpo anti-AQP4 foi possível demonstrar que houve expressão da proteína recombinante de interesse, como mostra a figura 22. Foram aplicados 80 μ L do conteúdo total das proteínas resultantes das induções. Os valores em μ g de proteína aplicados no gel para Western blot estão indicados na Tabela 17.

Tabela 17. Valores em μg de proteína aplicados em cada poço do gel para Western blot da linhagem C41 pET28a-GST-AQP4.

	Pré-indução (ug)	Pós-indução (ug)
C41 pET28a-GST-AQP4 sol	0,192	1,240
C41 pET28a-GST-AQP4 insol	0,004	0,084

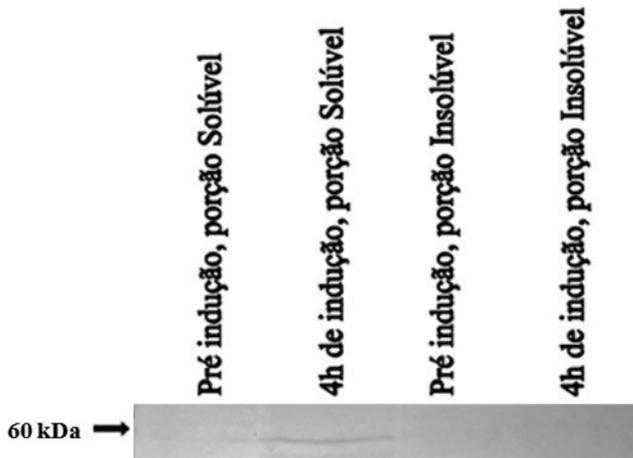


Figura 22. Western blot da confirmação da expressão da proteína AQP4 na linhagem C41 com pET28a-GST-AQP4. Apenas a fração pós-indução da porção solúvel apresenta banda na altura esperada da expressão da AQP4r ligada ao GST, com 60 kDa.

4.5 Construção 3 – pET SUMO-AQP4

A Figura 15, exibida previamente, demonstra a eletroforese em gel de agarose (1%) da amplificação do inserto da AQP4 realizada por PCR, a partir do plasmídeo pDNR-LIB contendo a sequência do gene da subunidade M1 da AQP4, com os *primers* AQP4SacIF e AQP4XhoIR. Após a digestão do fragmento obtido com as enzimas XhoI e SacI, este foi clonado no vetor pET SUMO. O resultado da clonagem do fragmento de

900 pb (AQP4) com o vetor de expressão pET SUMO de 5,6 kb é de um plasmídeo pET SUMO-AQP4, com 6,5 kb. Essa terceira construção foi linearizada por digestão simples com a enzima de restrição XhoI e é mostrada na Figura 23.

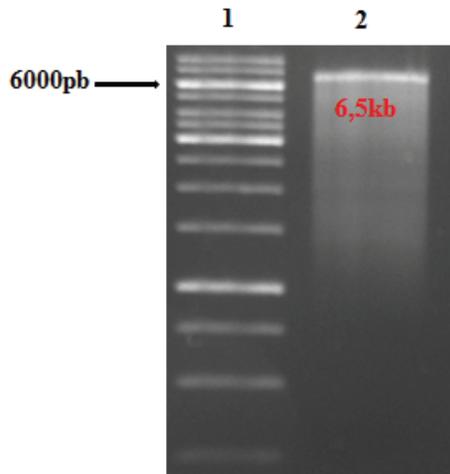


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) do produto da clonagem do vetor pET SUMO com o inserto AQP4. (1) Marcador molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas), (2) Construção 1 (pET SUMO-AQP4) com 6,5 kb.

O plasmídeo resultante da clonagem, pET SUMO-AQP4, foi então submetido a nova reação de PCR, com os *primers* da amplificação do inserto (com os *primers* AQP4SacIF e AQP4XhoIR), para confirmar a presença do gene da AQP4 na construção. Utilizando uma temperatura de anelamento de 58° C na reação de PCR, a Figura 24 mostra a confirmação da presença do inserto na construção 3.

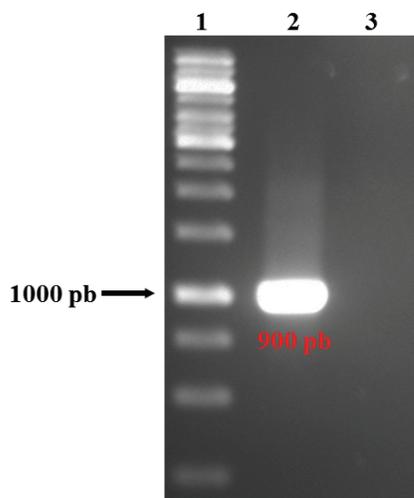


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) da confirmação da clonagem pET SUMO-AQP4 por PCR. (1) Marcador molecular *GeneRuler* 1 kb DNA Ladder (Fermentas), (2) Amplificação do inserto AQP4 na temperatura 58° C com 900 pb e (3) Amplificação do controle negativo do PCR na temperatura 58° C em que DNA = água milliQ.

Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo pET SUMO contendo o gene da AQP4 foi utilizado para eletroporar linhagens de *E. coli* para expressão da proteína recombinante. Após a indução da expressão com IPTG, o conteúdo total das proteínas produzidas por linhagem foi quantificado pelo método de Bradford. O resultado da quantificação proteica resultante das induções de expressão das linhagens BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS estão apresentadas a seguir.

A Tabela 18 mostra as concentrações proteicas expressas pelo vetor da construção 3 (pET SUMO-AQP4), porções solúvel e insolúvel, nas linhagem BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS nos momentos préindução e pós-indução. Ainda, a Tabela 18 também apresenta a razão dos valores pré e pós induzidos, mostrando

quantas vezes a concentração proteica aumentou após a introdução do IPTG. A Figura 25 mostra o gráfico que representa o aumento das concentrações totais de proteína.

Tabela 18. Tabela do resultado da indução da expressão do vetor da construção 3 (pET SUMO-AQP4) nas diferentes linhagens de expressão.

	Pré-indução (ug/mL)	Pós-indução (ug/mL)	Razão Pós/Pré
C41 pET SUMO-AQP4 Sol	0,9	3,7	4,1
C41 pET SUMO-AQP4 Insol	1,45	6,9	4,8
C43 pET SUMO-AQP4 Sol	0,9	3,95	4,4
C43 pET SUMO-AQP4 Insol	0,95	4,1	4,3
pLysS pET SUMO-AQP4 Sol	1,4	4,95	3,5
pLysS pET SUMO-AQP4 Insol	1,3	5,1	3,9

Sol = porção solúvel, insol = porção insolúvel.

Induções da construção 3 - pETSUMO-AQP4

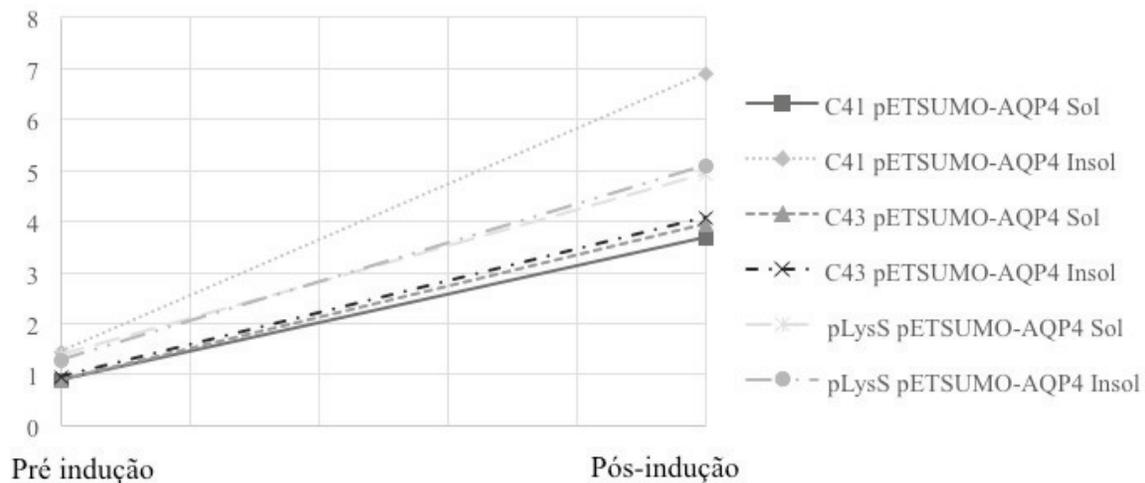


Figura 25. Gráfico demonstrativo das concentrações das proteínas totais da construção 3 (pET SUMO-AQP4) nas linhagens BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 e BL21 (DE3) pLysS nos momentos pré e pós-indução.

O extrato de proteínas totais foi, então, submetido à separação eletroforética por SDS-PAGE, com o intuito de determinar se a indução da expressão dos genes sob o controle do promotor T7 havia sido bem-sucedida. As figuras 26, 27 e 28 mostram a separação por peso molecular do conteúdo total das proteínas resultantes das 3 linhagens contendo o plasmídeo pET SUMO-AQP4 nos momentos pré e pós-indução com IPTG e sugerem o sucesso das induções da proteína AQP4r ligada ao SUMO, com 47 kDa. Foram aplicados 30 μ L de amostra em cada poço. Os valores em μ g de proteína aplicados estão indicados nas Tabelas 19, 20 e 21.

Tabela 19. Valores em μ g de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem C41 pET SUMO-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
C41 pET SUMO-AQP4 sol	0,062	0,135
C41 pET SUMO-AQP4 insol	0,036	0,096

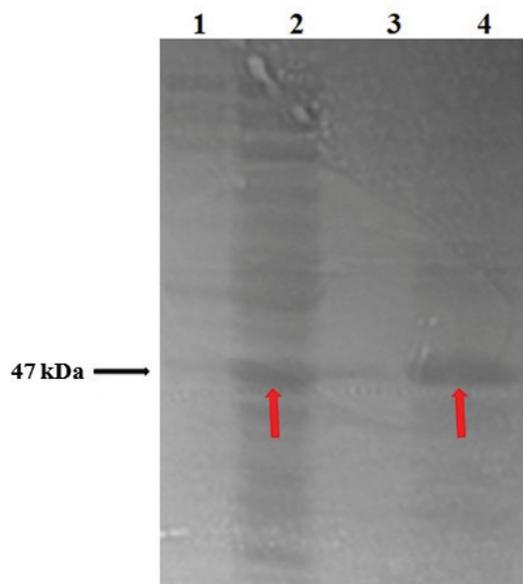


Figura 26. Gel SDS-Page do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C41 contendo o plasmídeo pET SUMO-AQP4, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução. As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r ligada ao SUMO, com 47 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

Tabela 20. Valores em μg de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem C43 pET SUMO-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
C43 pET SUMO-AQP4 sol	0,027	0,119
C43 pET SUMO-AQP4 insol	0,029	0,123

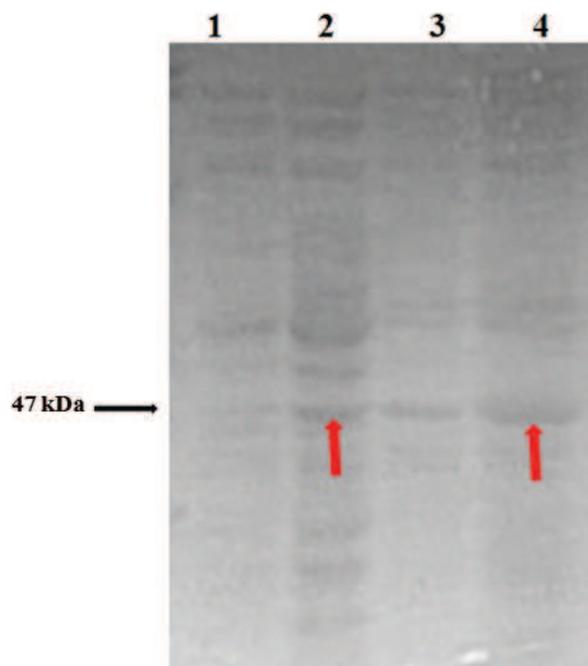


Figura 27. Gel SDS-Page do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C43 contendo o plasmídeo pET SUMO-AQP4, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução. As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r ligada ao SUMO, com 47 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

Tabela 21. Valores em μg de proteína aplicados em cada poço do gel SDS-PAGE da linhagem pLysS pET SUMO-AQP4.

	Préindução (ug)	Pós-indução (ug)
pLysS pET SUMO-AQP4 sol	0,042	0,149
pLysS pET SUMO-AQP4 insol	0,039	0,153

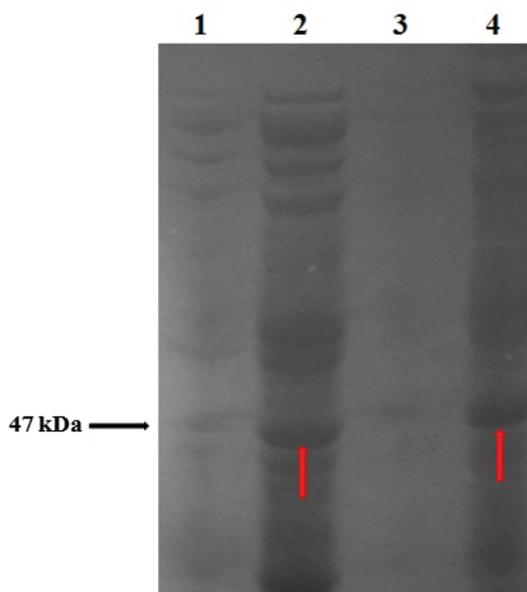


Figura 28. Gel SDS-Page do resultado da indução de expressão proteica da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET SUMO-AQP4, corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Fração solúvel do conteúdo proteico préindução, (2) Fração solúvel do conteúdo proteico pós 4 horas de indução, Fração insolúvel do conteúdo proteico préindução e (4) Fração insolúvel do conteúdo proteico após 4 horas de indução. As bandas que sugerem êxito na indução da expressão da AQP4r ligada ao SUMO, com 47 kDa, estão apontadas pelas setas vermelhas.

A técnica de Western blot foi utilizada então para verificar se o resultado apresentado no gel de SDS-PAGE correspondia ao sucesso na expressão específica da AQP4r pelo plasmídeo pET SUMO-AQP4. Utilizando o anticorpo anti-AQP4 foi possível demonstrar que houve expressão da proteína recombinante de interesse, como mostra a Figura 29. Foram aplicados 80 μ L do conteúdo total das proteínas resultantes das induções. Os valores em μ g de proteína aplicados no gel para Western blot estão indicados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores em μg de proteína aplicados em cada poço do gel para Western blot da linhagem pLysS pET SUMO-AQP4.

	Préindução (μg)	Pós-indução (μg)
pLysS pET SUMO-AQP4 sol	0,108	0,464
pLysS pET SUMO-AQP4 insol	0,02	0,104

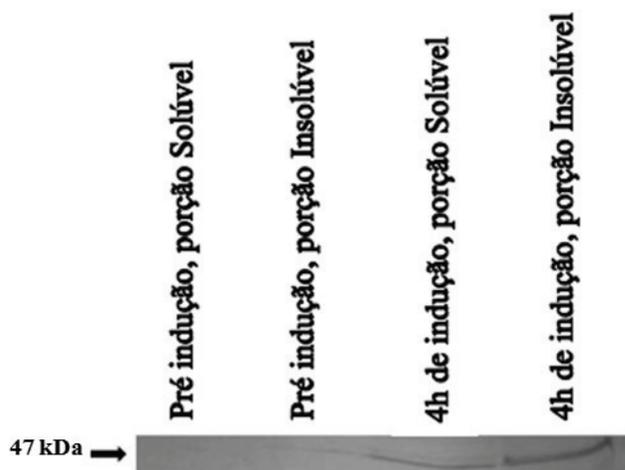


Figura 29. Western blot da confirmação da expressão da proteína AQP4 na linhagem pLysS com pET SUMO-AQP4. As frações pós-indução apresentam banda na altura esperada da expressão da AQP4r ligada ao SUMO, com 47 kDa.

4.6 ELISA

Os pacientes do Dr. Felipe von Glehn foram testados também para a presença de anticorpo anti-MOG. O gráfico abaixo (Fig. 30) apresenta os dados obtidos através do ELISA.

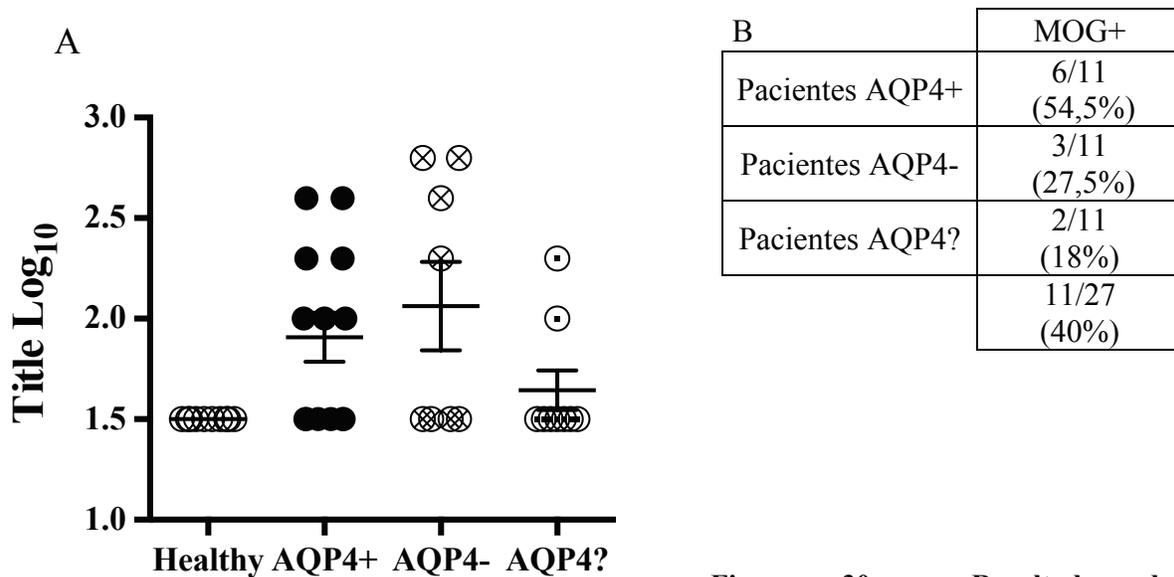


Figura 30. Resultado do

imunoensaio para soropositividade para o anticorpo anti-MOG em pacientes com diagnóstico positivo para NMO. (A) Gráfico do título no \log_{10} do anticorpo anti-MOG no soro dos pacientes de NMO. (B) Tabela das porcentagens de pacientes soropositivos.

5. Discussão

As doenças de caráter desmielinizantes, como a NMO e a EM, são grandes causadoras de déficit neurológico em adultos jovens. Para diminuir os danos causados por essas doenças, é importante o diagnóstico precoce e preciso dessas patologias desmielinizantes. A NMO foi durante muito tempo classificada como uma forma óptico-espinal da EM (1). No entanto, estudos realizados principalmente na última década mostraram que as duas patologias apresentavam características distintas. Os tratamentos que mostraram benefícios para os pacientes de EM não afetaram o curso natural da NMO (83). Ainda, recentemente se demonstrou que uma alta porcentagem dos pacientes de NMO apresentam auto-anticorpos para a AQP4, o que não acontece com os pacientes de EM (33). Atualmente, o diagnóstico da NMO é baseado em achados de neuroimagem, laboratoriais e pelo teste de imunofluorescência indireta que identifica a presença de anticorpos anti-AQP4 nos pacientes com NMO. Porém, os achados de neuroimagem e laboratoriais muitas vezes são inconclusivos, já que os resultados podem se assemelhar com os de outras doenças desmielinizantes, principalmente a EM. No entanto, como os pacientes com EM são soronegativos para tal anticorpo, o teste para a presença de autoanticorpos anti-AQP4 no soro dos pacientes é importante na distinção das duas doenças. O método disponível atualmente para detecção de anticorpos anti-AQP4 é o de imunofluorescência indireta. Os resultados obtidos nesse trabalho com os pacientes do Dr. Felipe von Glehn, mostram que os pacientes apresentam porcentagem de anticorpos anti-aquaporina-4 compatível com estudos anteriores realizados em outros países (33), que usaram a mesma metodologia empregada. Entretanto, essa método é bastante

complexo e de alto custo. O estabelecimento de métodos complementares para a detecção do anticorpo anti-AQP4 poderia ajudar no diagnóstico precoce da NMO. Para isso, o novo método empregado teria que consistir em técnicas rápidas, precisas e também de baixo custo, com fácil reprodutibilidade. Para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnósticos para a identificação de anticorpos anti-AQP4, se faz necessário a obtenção da AQP4 recombinante. Além de propiciar o estabelecimento de novos métodos de diagnóstico, a obtenção da AQP4 pode ajudar também no melhor entendimento dos mecanismos imunológicos da NMO. Desta forma, expressar essa proteína recombinante foi o objetivo desse trabalho.

Diversos sistemas de expressão poderiam ser aplicados para a expressão da AQP4 recombinante, seja em hospedeiros procariotos e eucariotos, incluindo neste último caso sistemas de expressão em leveduras, fungos filamentosos, células vegetais e células animais. Nesse estudo nós escolhemos o sistema de expressão em *E. coli* que apresenta grandes vantagens por já ser extensamente utilizado comercialmente, devido ao vasto conhecimento genético e fisiológico dessa bactéria. Além disso, o sistema de expressão em *E. coli* apresenta rápido crescimento, geralmente um bom rendimento de expressão de proteínas heterólogas, baixo custo, além da grande diversidade de vetores de clonagem e expressão, de fácil controle da indução. No entanto, para o uso desse sistema deve se levar em consideração as modificações pós traducionais da proteína, uma vez que bactérias não são capazes de adicionar resíduos de açúcares ou lipídios após a tradução, o que seria possível em um sistema eucarioto. Ainda, para a produção de proteínas humanas deve-se levar em conta a utilização de códons preferenciais pela bactéria para determinados aminoácidos, que podem ser diferentes dos códons usados nos sistemas

eucariotos. Entretanto, a AQP4 apresenta apenas fosforilações como modificações pós traducionais, uma modificação que as bactérias são capazes de realizar. Neste estudo, para maximizar a expressão dessa proteína heteróloga, foram utilizados 3 vetores de expressão para o sistema de *E. coli*. A sequência de cDNA do gene da subunidade M1 da AQP4 foi clonado com sucesso nos 3 vetores de expressão escolhidos para esse trabalho. Os vetores e sistemas de expressão foram escolhidos para facilitar a purificação, a solubilidade e a otimização de códons. A partir dessas clonagens, foi possível avaliar a expressão da AQP4 em 3 linhagens distintas de *E. coli*. Para isso, 3 linhagens especializadas em expressão de proteínas recombinantes heterólogas foram utilizadas: BL21 (DE3) C41, BL21 (DE3) C43 (81) e BL21 (DE3) pLysS. A partir da análise da expressão através da técnica de SDS-PAGE e Western blot foi possível demonstrar que todas as combinações de vetores e linhagens de expressão foram capazes de expressar a AQP4 recombinante. Interessantemente, o uso da proteína de fusão GST parece ter aumentado a quantidade absoluta (amostra não normalizada) de AQP4r na fração solúvel, o que não foi observado com o uso na proteína de fusão SUMO. Esse fato é extremamente importante para a posterior purificação dessa proteína, uma vez que o processo de purificação de proteínas insolúveis, como é o caso da AQP4 é extremamente trabalhosa e complicada. Ainda, apesar de ainda não terem sido realizadas as análises após a normalização da quantidade total de proteínas, a linhagem C41 parece apresentar o melhor rendimento absoluto após a indução com o IPTG, pois, em teoria, o IPTG seria capaz de induzir expressão somente dos genes sob o comando do promotor T7, induzível pelo IPTG, como é no caso do gene da AQP4. Com essa observação é possível inferir que

os aumentos significativos de concentração proteica observados nas amostras pós-induções representam a expressão da AQP4r.

As linhagens C41 e C43, mutantes derivados de *E. coli* BL21, foram selecionados para maior expressão de proteínas de membrana (81) e foram utilizados com eficiência na expressão de proteínas de membrana mitocondriais (84, 85). Quick & Wright (2002) (86) demonstraram baixa expressão de uma proteína de membrana humana quando expressa nessas linhagens. Por outro lado, estes mesmos autores descreveram elevados níveis de expressão utilizando *E. coli* BL21. Portanto, a eficiência dessas linhagens na expressão de proteínas de membrana parece ser dependente do tipo de proteína expressa.

É possível que o rendimento na expressão da proteína de membrana humana AQP4 na linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C41 seja o mais vantajoso em relação às outras linhagens de expressão utilizadas nesse trabalho devido à mutação presente nessa linhagem (81). No entanto esta mutação ainda não está completamente descrita, tornando difícil determinar qual seria o verdadeiro benefício desta para a expressão de proteínas heterólogas de membrana.

Desta forma, os dados obtidos nesse estudo sugerem o uso da construção plasmidial pET28a-GST-AQP4 em *E. coli* BL21 (DE3) C41 como sendo a mais apropriada para a purificação de AQP4r já que a totalidade da proteína expressa se encontrava na fração solúvel, tornando a futura purificação muito mais simples e abrindo a possibilidade de seu uso no preparo de testes diagnóstico para NMO.

O teste para presença do anticorpo anti-MOG nos pacientes da NMO foi realizado através da técnica de ELISA e mostrou que dos 27 pacientes testados, 11 apresentaram anticorpo anti-MOG. Desses 11, 6 pacientes também foram classificados

pela técnica de imunofluorescência indireta soropositivos para o anticorpo anti-AQP4, 3 foram testados soronegativos para o anti-AQP4 e os 2 pacientes restantes ainda não passaram pelo teste de imunofluorescência para a presença do anti-AQP4. Esse resultado poderia indicar que os autoanticorpos anti-MOG poderiam participar da patogênese da doença. É possível que as duas proteínas (AQP4 e MOG) apresentem epítomos em comum, o que geraria uma resposta autoimune às duas proteínas para alguns pacientes, provavelmente aqueles que seriam geneticamente susceptíveis a responder a essas proteínas. A maior expressão de MOG no nervo óptico e medula espinhal em relação ao cérebro seria um indício que essa proteína poderia ser um alvo na NMO, uma vez que essa patologia apresenta lesões quase sempre confinadas à essas regiões. Por outro lado, sabe-se que pacientes portadores de doenças autoimunes mediadas por anticorpos frequentemente desenvolvem uma gama de autoanticorpos. Em teoria, esses pacientes teriam uma predisposição global ao desenvolvimento de autoanticorpos, e não somente para o antígeno primário da doença.

Diante do exposto, nesse estudo fomos capazes de demonstrar com sucesso um método de expressão de AQP4 em *E. coli*. A purificação dessa proteína ajudará a melhorar ou pelo menos reforçará a metodologia de detecção dos autoanticorpos anti-AQP4. Ainda, a obtenção da AQP4 recombinante proporcionará novos estudos sobre os mecanismos humorais e celulares da NMO, o que futuramente levará a um aprimoramento do entendimento dessa patologia, assim como o desenvolvimento de novas terapias. Apesar de ainda existirem poucos estudos que correlacionam anticorpos anti-MOG com NMO, os dados apresentados por esses estudos são coerentes com o nosso trabalho em relação a soroprevalência do anti-MOG em pacientes com diagnóstico

confirmado de NMO, que gira em torno de 37,5%. (66, 64, 65), o que reforça a possível participação desse neuroantígeno na patologia da NMO.

6. Conclusões

- O gene da subunidade M1 da proteína AQP4 foi clonado e a proteína resultante foi expressa nas linhagens de *E. coli* escolhidas para esse trabalho.
- A avaliação sorológica dos pacientes recrutados para esse trabalho mostrou soropositividade para os autoantígenos AQP4 e MOG em proporções que seguem os padrões apresentados em trabalhos semelhantes publicados por outros grupos, seguindo a mesma metodologia.
- A análise dos valores absolutos apresentados na quantificação do extrato total de proteínas expressas, indica melhor eficiência de solubilização da subunidade M1 da proteína humana AQP4 na linhagem C41, com a construção plasmidial pET28a-GST-AQP4.
- Os esforços no sentido de alcançar maior solubilização da proteína transmembrânica AQP4 foi bem sucedido, já que na técnica de Western blot foi possível observar a presença de banda também na porção solúvel dos extratos proteicos, principalmente com a construção plasmidial pET28a-GST-AQP4.

7. Referências

1. Wingerchuk, D. M., Lennon, V. A., Lucchinetti, C. F., Pittock, S. J. & Weinshenker, B. G. The spectrum of neuromyelitis optica. *The Lancet Neurology* **6**, 805–815 (2007).
2. Cabrera-Gómez, J. A., Kurtzke, J. F., González-Quevedo, A. & Lara-Rodríguez, R. An epidemiological study of neuromyelitis optica in Cuba. *J Neurol* **256**, 35–44 (2009).
3. Asgari, N. *et al.* A population-based study of neuromyelitis optica in Caucasians. *Neurology* **76**, 1589–1595 (2011).
4. Rivera, J. F., Kurtzke, J. F., Booth, V. J. A. & Corona, T., V. Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico. *J Neurol* **255**, 710–715 (2008).
5. Cabre, P. *et al.* MS and neuromyelitis optica in Martinique (French West Indies). *Neurology* **56**, 507–514 (2001).
6. Kuroiwa, Y., Igata, A., Itahara, K., Koshijima, S. & Tsubaki, T. Nationwide survey of multiple sclerosis in Japan. Clinical analysis of 1,084 cases. *Neurology* **25**, 845–851 (1975).
7. Morrow, M. J. & Wingerchuk, D. M. Neuromyelitis optica. *Journal of Neuro-Ophthalmology* **32**, 154–166 (2012).
8. Jeffery, A. R. & Buncic, J. R. Pediatric Devic's neuromyelitis optica. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* **33**, 223–229 (1996).
9. Jarius, S. *et al.* Frequency and prognostic impact of antibodies to aquaporin-4 in patients with optic neuritis. *Journal of the Neurological Sciences* **298**, 158–162

- (2010).
10. O'Riordan, J. I. *et al.* Clinical, CSF, and MRI findings in Devic's neuromyelitis optica. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **60**, 382–387 (1996).
 11. Wingerchuk, D. M., Hogancamp, W. F., O'Brien, P. C. & Weinshenker, B. G. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* **53**, 1107–1114 (1999).
 12. Mandler, R. N., Davis, L. E., Jeffery, D. R. & Kornfeld, M. Devic's neuromyelitis optica: a clinicopathological study of 8 patients. *Annals of Neurology* **34**, 162–168 (1993).
 13. Wingerchuk, D. M., Lennon, V. A., Pittock, S. J., Lucchinetti, C. F. & Weinshenker, B. G. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* **66**, 1485–1489 (2006).
 14. Pittock, S. J. *et al.* Brain abnormalities in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* **63**, 390–396 (2006).
 15. Misu, T., Fujihara, K., Nakashima, I., Sato, S. & Itoyama, Y. Intractable hiccup and nausea with periaqueductal lesions in neuromyelitis optica. *Neurology* **65**, 1479–1482 (2005).
 16. Kim, S.-M., Go, M. J., Sung, J.-J., Park, K. S. & Lee, K.-W. Painful tonic spasm in neuromyelitis optica: incidence, diagnostic utility, and clinical characteristics. *Arch Neurol* **69**, 1026–1031 (2012).
 17. Iorio, R. R. *et al.* Intractable nausea and vomiting from autoantibodies against a brain water channel. *Clin Gastroenterol Hepatol* **11**, 240–245 (2013).
 18. Apiwattanakul, M. *et al.* Intractable vomiting as the initial presentation of

- neuromyelitis optica. *Annals of Neurology* **68**, 757–761 (2010).
19. Barnett, M. H. & Sutton, I. Neuromyelitis optica: not a multiple sclerosis variant. *Current Opinion in Neurology* **25**, 215–220 (2012).
 20. Parratt, J. D. & Prineas, J. W. Neuromyelitis optica: a demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes. *Mult. Scler.* **16**, 1156–1172 (2010).
 21. Mandler, R. N. Neuromyelitis optica — Devic's syndrome, update. *Autoimmunity Reviews* **5**, 537–543 (2006).
 22. Cree, B. A. C., Goodin, D. S. & Hauser, S. L. Neuromyelitis optica. *Semin Neurol* **22**, 105–122 (2002).
 23. Jacob, A. *et al.* Neuromyelitis optica: Changing concepts. *Journal of Neuroimmunology* **187**, 126–138 (2007).
 24. Lee, K. H. *et al.* Magnetic resonance imaging of the head in the diagnosis of multiple sclerosis: a prospective 2-year follow-up with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology* **41**, 657–660 (1991).
 25. Wingerchuk, D. M. & Weinshenker, B. G. Neuromyelitis Optica. *Curr Treat Options Neurol* **7**, 173–182 (2005).
 26. Cree, B. A. C. *et al.* An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica. *Neurology* **64**, 1270–1272 (2005).
 27. Kim, S.-H. *et al.* Clinical Efficacy of Plasmapheresis in Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and Effects on Circulating Anti-Aquaporin-4 Antibody Levels. *J Clin Neurol* **9**, 36 (2013).

28. Magaña, S. M. Beneficial Plasma Exchange Response in Central Nervous System Inflammatory Demyelination. *Arch Neurol* **68**, 870 (2011).
29. Watanabe, S. *et al.* Therapeutic efficacy of plasma exchange in NMO-IgG-positive patients with neuromyelitis optica. *Multiple Sclerosis* **13**, 128–132 (2007).
30. Wang, K.-C., Wang, S.-J., Lee, C.-L., Chen, S.-Y. & Tsai, C. P. The rescue effect of plasma exchange for neuromyelitis optica. *JOURNAL OF CLINICAL NEUROSCIENCE* **18**, 43–46 (2011).
31. Keegan, M. *et al.* Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response. *Neurology* **58**, 143–146 (2002).
32. Llufriu, S. *et al.* Plasma exchange for acute attacks of CNS demyelination: Predictors of improvement at 6 months. *Neurology* **73**, 949–953 (2009).
33. Lennon, V. A. *et al.* A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* **364**, 2106–2112 (2004).
34. Lennon, V. A., Kryzer, T. J., Pittock, S. J. & Wu, Q. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 473–477 (2005).
35. Crane, J. M. *et al.* Binding Affinity and Specificity of Neuromyelitis Optica Autoantibodies to Aquaporin-4 M1/M23 Isoforms and Orthogonal Arrays. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 16516–16524 (2011).
36. Nielsen, S. *et al.* Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci.* **17**, 171–180 (1997).
37. Jung, J. S. *et al.* Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain:

- candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 13052–13056 (1994).
38. Frigeri, A., Gropper, M. A., Turck, C. W. & Verkman, A. S. Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4328–4331 (1995).
 39. Yukutake, Y. & Yasui, M. Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience* (2009). doi:10.1016/j.neuroscience.2009.10.029
 40. Wingerchuk, D. M. Neuromyelitis optica: Effect of gender. *Journal of the Neurological Sciences* **286**, 18–23 (2009).
 41. Graber, D. J., Levy, M., Kerr, D. & Wade, W. F. Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4. *J Neuroinflammation* **5**, 22 (2008).
 42. Jarius, S. *et al.* Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation* **9**, 14 (2012).
 43. Banwell, B. *et al.* Neuromyelitis optica-IgG in childhood inflammatory demyelinating CNS disorders. *Neurology* **70**, 344–352 (2008).
 44. Nakashima, I. Clinical and MRI features of Japanese patients with multiple sclerosis positive for NMO-IgG. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **77**, 1073–1075 (2006).
 45. Adoni, T., Lino, A. M., Marchiori, P. E., Kok, F. & Callegaro, D. Seroprevalence of NMO-IgG antibody in Brazilian patients with neuromyelitis optica. *Arq Neuropsiquiatr* **66**, 295–297 (2008).

46. Matsuoka, T. *et al.* Heterogeneity of aquaporin-4 autoimmunity and spinal cord lesions in multiple sclerosis in Japanese. *Brain* **130**, 1206–1223 (2007).
47. Saadoun, S. & Papadopoulos, M. C. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *NSC* **168**, 1036–1046 (2010).
48. Lucchinetti, C. F. *et al.* A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* **125**, 1450–1461 (2002).
49. Jarius, S. *et al.* Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* (2008).
50. Matiello, M. *et al.* NMO-IgG predicts the outcome of recurrent optic neuritis. *Neurology* **70**, 2197–2200 (2008).
51. Bonnan, M. *et al.* Plasma exchange in severe spinal attacks associated with neuromyelitis optica spectrum disorder. *Multiple Sclerosis* **15**, 487–492 (2008).
52. Jacob, A. *et al.* Treatment of neuromyelitis optica with rituximab: retrospective analysis of 25 patients. *Arch Neurol* **65**, 1443–1448 (2008).
53. Jarius, S. *et al.* Mechanisms of Disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nat Clin Pract Neurol* (2008). doi:10.1038/ncpneuro0764
54. Rostásy, K., Mader, S., Schanda, K., Huppke, P. & Wu, Q. Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in pediatric patients with optic neuritis. *Archives of ...* (2012).
55. Quarles, R. H. Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cellular and molecular life sciences* (2002).
56. Amiguet, P., Gardinier, M. V., Zanetta, J. P. & Matthieu, J. M. Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte

- glycoprotein. *J. Neurochem.* **58**, 1676–1682 (1992).
57. Meinl, E., Krumbholz, M. & Hohlfeld, R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: Migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of Neurology* **59**, 880–892 (2006).
 58. Weinshenker, B. G. *et al.* Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Annals of Neurology* **59**, 566–569 (2006).
 59. Mader, S. *et al.* Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation* **8**, 184 (2011).
 60. Kitley, J. *et al.* Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology* **79**, 1273–1277 (2012).
 61. Di Pauli, F. *et al.* Temporal dynamics of anti-MOG antibodies in CNS demyelinating diseases. *Clinical Immunology* **138**, 247–254 (2011).
 62. Linington, C. & Lassmann, H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *Journal of Neuroimmunology* **17**, 61–69 (1987).
 63. Litzemberger, T. *et al.* B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J. Exp. Med.* **188**, 169–180 (1998).
 64. Haase, C. G. & Schmidt, S. Detection of brain-specific autoantibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein, S100 β and myelin basic protein in patients with

- Devic's neuromyelitis optica. *Neuroscience letters* (2001).
65. Kezuka, T., Usui, Y., Yamakawa, N. & Wu, Q. Relationship Between NMO-Antibody and Anti-MOG Antibody in Optic Neuritis. *Journal of Neuro- ...* (2012).
 66. Rostásy, K. *et al.* Persisting myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in aquaporin-4 antibody negative pediatric neuromyelitis optica. *Mult. Scler.* (2012). doi:10.1177/1352458512470310
 67. Bettelli, E., Baeten, D., Jäger, A., Sobel, R. A. & Kuchroo, V. K. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J. Clin. Invest.* **116**, 2393–2402 (2006).
 68. Jarius, S. & Wildemann, B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nature Publishing Group* **6**, 383–392 (2010).
 69. Ndifuna, A., Waters, A. K., Zhou, M. & Collisson, E. W. Recombinant nucleocapsid protein is potentially an inexpensive, effective serodiagnostic reagent for infectious bronchitis virus. *J. Virol. Methods* **70**, 37–44 (1998).
 70. Loa, C. C., Adelson, M. E., Mordechai, E., Raphaelli, I. & Tilton, R. C. Serological Diagnosis of Human Babesiosis by IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Curr Microbiol* **49**, 385–389 (2004).
 71. Studier, F. W. & Moffatt, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130 (1986).
 72. Yamabhai, M., Buranabanyat, B., Jaruseranee, N. & Songsiriritthigul, C. Efficient *E. coli* expression systems for the production of recombinant β -mannanases and

- other bacterial extracellular enzymes. *biobugs* **2**, 45–49 (2011).
73. Kataeva, I. *et al.* Improving Solubility of *Shewanellaoneidensis*MR-1 and *Clostridiumthermocellum*JW-20 Proteins Expressed into *Escherichiacoli*. *J. Proteome Res.* **4**, 1942–1951 (2005).
 74. Inouye, M., Arnheim, N. & Sternglanz, R. Bacteriophage T7 lysozyme is an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase. *J. Biol. Chem.* **248**, 7247–7252 (1973).
 75. Dingermann, T. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnol. J.* **3**, 90–97 (2008).
 76. Apweiler, R., Hermjakob, H. & Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 4–8 (1999).
 77. Cohen, P. The origins of protein phosphorylation. *Nature cell biology* (2002).
 78. Neely, J. D., Christensen, B. M., Nielsen, S. & Agre, P. Heterotetrameric Composition of Aquaporin-4 Water Channels †. *Biochemistry* **38**, 11156–11163 (1999).
 79. Gustafsson, C., Govindarajan, S. & Minshull, J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in biotechnology* (2004).
 80. Sambrook, J. & Russell, D. *Molecular Cloning*. (2001).
 81. Miroux, B. & Walker, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* **260**, 289–298 (1996).
 82. Syrový, I. & Hodný, Z. Staining and quantification of proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Chromatogr.* **569**, 175–196 (1991).

83. Axtell, R. C., Raman, C. & Steinman, L. Interferon- β exacerbates Th17-mediated inflammatory disease. *Trends in Immunology* **32**, 272–277 (2011).
84. Fiermonte, G. *et al.* The sequence, bacterial expression, and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **273**, 24754–24759 (1998).
85. Fiermonte, G. Identification of the Mitochondrial Glutamate Transporter. BACTERIAL EXPRESSION, RECONSTITUTION, FUNCTIONAL CHARACTERIZATION, AND TISSUE DISTRIBUTION OF TWO HUMAN ISOFORMS. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 19289–19294 (2002).
86. Quick, M. & Wright, E. M. Employing *Escherichia coli* to functionally express, purify, and characterize a human transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8597–8601 (2002).
87. Zanchin, NI. Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochem Biophys Res Commun* **343**, 260–268 (2006).
88. Kobir, A *et al.* Protein phosphorylation in bacterial signal transduction. *Biophysica Acta* **1810**, 989-994 (2011).

8. Anexos

Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme resolução 196/96.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme resolução 196/96.

Projeto: Interação dos linfócitos T e B responsáveis pela produção do anticorpo anti-aquaporina 4 na neuromielite ótica e quantificação desse anticorpo na mielopatia associada ao HTLV-I.

Pesquisador Responsável: Felipe von Glehn

Data: _____

Justificativa e Objetivos: A Neuromielite Óptica (NMO) é uma doença inflamatória auto-imune, que acomete adultos jovens. A incidência de tal doença em nosso meio vem aumentando, causando preocupação nos especialistas. Acredita-se atualmente que as lesões causadas pela Neuromielite Óptica sejam resultadas de uma agressão de um anticorpo contra o próprio organismo, gerando os surtos e a piora da doença. Este processo de auto-agressão, por que ele ocorre e quais células de defesa estão alteradas, é pouco compreendido. Por esta razão, estamos realizando este trabalho de pesquisa, para estudar que células estão envolvidas e por que este auto anticorpo se forma, estudando o processo inflamatório no líquido e sangue dos pacientes que aceitarem a participação. Os resultados podem ajudar na criação futura de novos métodos diagnósticos e tratamentos.

Os pacientes serão estudados durante o acompanhamento normal que já realiza no ambulatório de EM.

Procedimentos: O paciente durante procedimento diagnóstico no ambulatório de neurologia da UNICAMP / HC será perguntado da autorização para coleta de 10ml do líquido (obtida pela punção lombar) e 10ml do sangue para os estudos. Não é necessário estar em jejum e nem interromper medicações utilizadas.

Risco e Desconforto: A coleta do líquido será realizada nas costas (região lombar). A dor que acompanha a punção lombar é semelhante aquela da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois será realizada com anestesia local por profissional treinado e devidamente habilitado para a realização de punção lombar. Após submeter-se a punção lombar, o paciente deverá permanecer em repouso em casa, por 24 horas, e aumentar a ingestão de líquidos. Este repouso é importante para evitar dor de cabeça após a punção, impossibilitando a realização das atividades habituais. Se houver dor, mesmo com o repouso, o paciente deverá permanecer por mais alguns dias sem atividades e ingerir a medicação prescrita pelo seu médico. Este tipo de dor de cabeça não traz qualquer prejuízo ao paciente, mas necessita de repouso para desaparecer.

A coleta do líquido por utilizar agulha apresenta os riscos inerentes ao procedimento. São descritas, raramente, intercorrências da punção, como dormências transitórias, dor local e infecção. Entretanto, a incidência destas complicações é baixa. O material é descartável e as agulhas atuais (modelo 22Gx 3.5 = 70x7) são mais finas e de excelente qualidade. Caso ocorra qualquer desconforto após o procedimento, o paciente deverá contatar a

equipe de atendimento do HC - UNICAMP e a equipe de pesquisa, que orientarão as medidas a serem tomadas para aliviar os sintomas, sem nenhum custo.

Benefícios: Melhor entendimento da Neuromielite Óptica para ajudar na criação futura de novos métodos diagnósticos e terapêuticos. Não existe benefício imediato para o paciente.

Esclarecimento: Todas as dúvidas e perguntas do paciente quanto aos assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento serão esclarecidas pelos pesquisadores.

Recusa ou descontinuação da participação: Durante o decorrer do estudo informaremos ao paciente o andamento da pesquisa, podendo este deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo no atendimento que recebe pelo HC – UNICAMP, caso decida não colaborar com a equipe, pois a participação do paciente é voluntária.

Sigilo: As informações recebidas durante e depois do estudo e a privacidade dos pacientes serão mantidas em sigilo. Os resultados serão sempre analisados em grupo, estatisticamente, não sendo possível identificar de forma individual qualquer paciente. Caso tenha alguma dúvida deverá procurar a Dr. Felipe von Glehn no telefone (19) 3521-6263, (19) 9769-0777

Gastos adicionais: Se houverem gastos adicionais (seringas, agulhas descartáveis, material de curativo...) estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Armazenamento de Material Biológico: Após o estudo realizado, geralmente sobra alguma quantidade de líquido e soro, que tem a capacidade de ser avaliada em novas pesquisas futuras, sem a necessidade de realizar procedimentos de punção, com todos os seus riscos e desconfortos. Eu autorizo não autorizo o estoque de meu material biológico para estudos futuros aprovados pelo Comitê de Ética da UNICAMP.

Eu confirmo que Felipe von Glehn me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li, e/ou me foi explicado, assim como compreendi e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar do estudo.

Paciente _____ ou Responsável: _____

Idade:

RG:

Endereço:

Assinatura: _____

Responsabilidade do pesquisador. Eu expliquei a _____ o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Felipe von Glehn

CRM-SP: 114233

Email: fglehn@terra.com.br

Tel.: (19) 9769-0777 / 3521-7754

Outros Membros da Equipe:

1) Carlos Otávio Brandão - Tel.:(19) 3521-7754 2) Benito Damasceno - Tel.:(19) 3521-7754

3) Leonilda dos Santos - Tel.:(19) 3521-6263 4) Augusto César Penalva de Oliveira

5) Comitê de Ética em Pesquisa

Tel.:(19) 3521-8936

Email: cep@fcm.unicamp.br

Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Caixa Postal 6111

13083-887 Campinas-SP

Qualquer intercorrências médicas, ligar para qualquer um dos membros da equipe.

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 28/01/11
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 1274/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1002.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “NEUROMIELITE ÓPTICA X MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I: CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-AQUAPORINA 4 NA DOENÇA AUTO-IMUNE E NA INFECÇÃO VIRAL”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Felipe von Glehn Silva

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/12/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 28/01/12 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Determinar a presença de anticorpos anti-Aquaporina 4 no soro de pacientes com Neuro-Mielite Óptica (NMO), com Mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM), com sorologia positiva para HTLV-1 e em indivíduos normais, correlacionando com a gravidade da doença; correlacionar os títulos com a função de linfócitos B e T; correlacionar com achados da ressonância magnética; acompanhar a evolução das lesões medulares e comparar com os níveis de anti-Aqua 4.

III - SUMÁRIO

Trata-se de um estudo observacional descritivo e comparativo onde serão avaliados pacientes com NMO, HAM e pacientes soropositivos para HTLV-1 acompanhados no ambulatório de Esclerose Múltipla e Neuroinfecologia do HC da Unicamp. A quantificação do anticorpo anti-Aqua 4 será feita através de imunofluorescência indireta recombinante. Sua avaliação auxilia o diagnóstico da NMO e será usada na comparação entre as patologias e com as imagens de ressonância para acompanhamento das lesões. Em conjunto serão avaliados os linfócitos B e T através de imunofenotipagem. As amostras serão coletadas no momento da inclusão no estudo, após 6 e 12 meses. Serão incluídos 25 pacientes com NMO, 25 com HAM, 25 pacientes assintomáticos com sorologia positiva para HTLV-1 e 25 controles sadios. Serão excluídos os pacientes com outras doenças auto-imunes além da NMO, com outras infecções além do HTLV-1 ou que recusarem participar. Além das amostras de sangue será coletado líquor dos pacientes, mas não dos controles. Será feita comparação entre os níveis de ACS dos 4 grupos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES



Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de janeiro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP