

PRODUÇÃO DA CITOCINA rIL-10 E ANTICORPO POLICLONAL PARA ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM HAMSTER SÍRIO DOURADO

ANA CAROLINA KURZ PEDRA¹; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA²; MARA ANDRADE COLARES MAIA²; TIFFANY THUROW BUNDE²; PEDRO HENRIQUE FILGUEIRAS COELHO SOUZA²; THAIS LARRÉ OLIVEIRA BOHN³

¹Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – carolpedraa@gmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – maracamaia@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – tiffany_bia@hotmail.com

²Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – pedroh577@hotmail.com

³Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – thais.larreoliveira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) é utilizado como modelo animal em estudos de doenças infecciosas, como leishmaniose, leptospirose e COVID-19, bem como de doenças não transmissíveis, como alguns tipos de câncer (MIAO et al., 2019). Este biomodelo é empregado em estudos envolvendo a progressão e fisiopatologia de doenças, o isolamento de microrganismos e, principalmente, o desenvolvimento e avaliação de novas terapias e vacinas contra diversas doenças (ZIVCEC et al., 2011). No entanto, para analisar mecanismos de ação e fatores que determinam ou não a eficácia de uma intervenção, seja ela profilática ou terapêutica, é frequentemente necessária a análise e caracterização da resposta imunológica envolvida.

A maioria dos estudos envolvendo a análise da imunidade em hamsters restringe-se à determinação da resposta humoral associada à isotipagem de anticorpos (MIAO et al., 2019). Porém, observa-se também a necessidade de caracterização da resposta imune celular, principalmente frente a novas formulações vacinais (DELLAGOSTIN et al., 2017) e terapias. A mensuração e avaliação do perfil de citocinas, proteínas responsáveis pelo “diálogo” entre células do sistema imune, é uma ferramenta que pode fornecer informações sobre os mecanismos de imunidade celular, fatores de prognóstico e avaliação prospectiva da eficácia de vacinas (CHIRATHAWORN; KONGPAN, 2014).

Para outros roedores, como ratos e camundongos, a técnica de ELISA é utilizada para a quantificação de citocinas a nível proteômico (WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER, 2017). Entretanto, em hamsters, essas análises são limitadas ao uso de ensaios transcricionais, como PCR quantitativo em tempo real, que permitem a avaliação dos níveis de mRNA de citocinas pró- e anti-inflamatórias (VERNEL-PAUILLAC; MERIEN, 2006). No entanto, técnicas transcricionais apresentam algumas limitações, incluindo o fato de não refletirem totalmente o proteoma. Consequentemente, a falta de insumos comerciais para determinação da resposta celular a nível proteômico em amostras biológicas de hamsters tem

impactado na queda do uso e do valor deste animal como biomodelo (MCCANN et al., 2017).

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel fundamental na resolução de infecções e inflamações, funcionando como um regulador chave das respostas inflamatórias do hospedeiro (PEÑALOZA et al., 2016). Diante da necessidade de caracterização do perfil de imunidade induzido em hamsters em estudos de diferentes áreas, o nosso trabalho teve como objetivo a produção da citocina IL-10 na forma recombinante e de anticorpos policlonais contra a mesma, a fim de se obter insumos que possam ser futuramente empregados no desenvolvimento de um ensaio para análise da resposta imune celular nesse modelo animal.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção e caracterização da citocina recombinante rIL-10: a sequência codificadora da citocina rIL-10 foi sintetizada quimicamente (GenOne) no vetor pET28a, para expressão em *Escherichia coli*. O vetor pET28a/il-10 foi utilizado para transformar a cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star por choque térmico. A expressão da proteína recombinante foi induzida utilizando isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Após a centrifugação, as células foram lisadas por sonicação e solubilizadas em tampão contendo 8 M de ureia como agente desnaturante. A proteína rIL-10 foi purificada através de cromatografia de afinidade utilizando colunas de sefarose carregadas com níquel em sistema ÄKTA start (GE Healthcare); as frações mais puras foram dialisadas contra tampão fosfato-salino (PBS) contendo concentrações decrescentes de ureia. As alíquotas purificadas foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. O reconhecimento da proteína foi avaliado através de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-6 $\times$ His conjugado com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich). As reações foram reveladas usando 3,3- diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

2.2 Produção de anticorpos policlonais (pAbs): a citocina purificada rIL-10 foi utilizada para a produção de anticorpos policlonais em três ratos Wistar com 6 semanas de idade. A imunização foi realizada em um esquema vacinal de três doses, com um intervalo de 21 dias entre a primeira e a segunda dose, e 14 dias entre a segunda e a terceira. Foram utilizados 50 μ g de proteína por dose, emulsificados em adjuvante de Freund (Sigma-Aldrich) completo para a primeira dose e as doses posteriores com adjuvante de Freund incompleto, conforme indicação do fabricante. O sangue foi coletado antes de cada imunização e o soro, separado por centrifugação para análises de ELISA e *Western blot*. A eutanásia dos animais foi realizada por aprofundamento de anestesia inalatória e o sangue foi coletado por exsanguinação cardíaca. Todos os procedimentos descritos acima foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPel (12207-2020).

2.3 Western blot e titulação do anticorpo policlonal: a avaliação do soro quanto à sua sensibilidade e especificidade de detecção de rIL-10 foi feita através de *Western blot*. Para isso, amostras da proteína rIL-10 nas concentrações de 100 ng até 1,562 ng (diluições em base dois) foram separadas através de SDS-PAGE 15% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Além disso, foi adicionado um controle negativo, a citocina rIL-10 de camundongo, obtida de um kit comercial (BD Biosciences). Após o bloqueio da membrana com leite em pó 5%,

os pAbs foram adicionados em uma diluição de 1:100, seguido da adição de anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (diluição 1:5000). Em seguida, as reações foram reveladas com 3,3'- diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. A titulação do anticorpo policlonal foi realizada por ELISA indireto. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 200 ng da citocina recombinante. Foram realizadas diluições seriadas de base dois, de 1:200 até 1:1.638,400. O título foi considerado como a maior diluição em que os soros apresentaram absorvância maior que o ponto de corte. O ponto de corte foi calculado usando a média $\pm$ dois desvios padrão (DP) dos valores de absorvância obtidos para os soros dos animais pré-imunização. Anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (1:5000) foi utilizado como anticorpo secundário. Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e a absorvância foi determinada a 492 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão heteróloga e a produção e purificação da citocina recombinante foram eficientes. O *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-histidina permitiu demonstrar o reconhecimento da citocina no tamanho esperado de 19,8 kDa. A obtenção dos anticorpos policlonais produzidos em ratos foi realizada com sucesso. No *Western blot*, o pAb anti-rIL-10 foi capaz de reagir com a proteína na sua forma recombinante, de forma específica, até a concentração 6,25 ng, demonstrando sua sensibilidade. Além disso, a citocina rIL-10 de camundongo, usada como controle negativo, não foi reconhecida pelo pAb, confirmando a característica espécie-específica do insumo produzido (Figura 1).

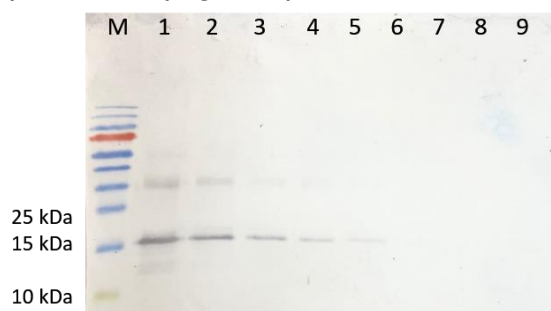


Figura 1: Caracterização dos pAbs produzidos contra a proteína rIL-10 por *Western blot*; M- Marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific, USA); 1- 100 ng; 2- 50 ng; 3- 25 ng; 4- 12,5 ng; 5- 6,25 ng; 6- 3,12 ng; 7- 1,56 ng; 8- *E. coli* BL21 STAR; 9- IL-10 de camundongo.

A titulação dos anticorpos policlonais por ELISA indireto foi considerada eficiente. A maior diluição onde foi possível observar absorvância maior que o ponto de corte foi 1:102.400, sendo assim, este foi considerado o título (Figura 2).

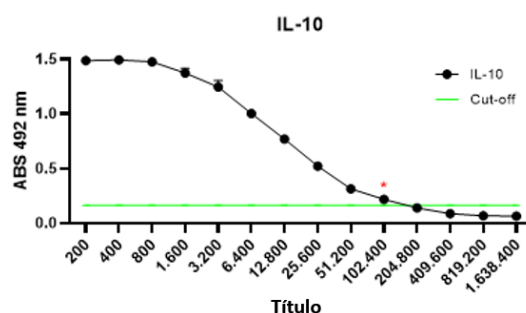


Figura 2: Titulação dos pAbs anti-rIL-10 por ELISA indireto. A linha verde refere-se ao *cut-off*. O asterisco refere-se ao título do soro produzido.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, demonstramos a produção e caracterização da citocina IL-10 de hamster sírio na forma recombinante, assim como a produção de anticorpos policlonais específicos contra a citocina produzida, demonstrando a reatividade destes reagentes. Futuramente, pretendemos validar os anticorpos produzidos frente a amostras biológicas de hamsters, que contenham a citocina na forma nativa. Além disso, também pretendemos produzir anticorpos monoclonais contra esta e outras citocinas de hamster visto que esses insumos poderão ser utilizados para o desenvolvimento de novos ensaios e ferramentas para quantificação de efetores séricos em amostras biológicas de hamster sírio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIRATHAWORN, C.; KONGPAN, S. Immune responses to *Leptospira* infection: Roles as biomarkers for disease severity. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 77–81, 2014.

DELLAGOSTIN, O. A. et al. Reverse vaccinology: An approach for identifying leptospiral vaccine candidates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, 2017.

MELBY, P.C., TRYON, V. V., CHANDRASEKAR, B. & FREEMAN, G.L. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2135–2142, 1998.

MIAO, J. et al. Syrian Hamster as an Animal Model for the Study on Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n.1, p. 1–12, 2019.

Peñaloza HF, Schultz BM, Nieto PA, et al. Opposing roles of IL-10 in acute bacterial infection. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 32, n., p. 17–30, 2016.

VERNEL-PAUILLAC, F.; MERIEN, F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 4172–4179, 2006.

WARNER, B. M.; SAFRONETZ, D.; KOBINGER, G. P. Syrian hamsters as a small animal model for emerging infectious diseases: Advances in immunologic methods. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 972, p. 87–101, 2017.

ZIVCEC, M. et al. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Immunological Methods**, v. 368, n. 1–2, p. 24–35, 2011.