

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Caracterização da atividade biológica de citocinas recombinantes de hamster
sírio dourado (*Mesocricetus auratus*)**

Laura de Vargas Maiocchi

Pelotas, 2025

Laura de Vargas Maiocchi

Caracterização da atividade biológica de citocinas recombinantes de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thais Larré Oliveira Bohn

Coorientadoras: Dr.^a Natasha Rodrigues de Oliveira

Dr.^a Mara Andrade Colares Maia

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

M217c Maiocchi, Laura de Vargas

Caracterização da atividade biológica de citocinas recombinantes de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) [recurso eletrônico] / Laura de Vargas Maiocchi ; Thais Larré Oliveira Bohn, orientadora ; Natasha Rodrigues de Oliveira, Mara Andrade Colares Maia, coorientadoras. — Pelotas, 2025.
50 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Imunidade celular. 2. Modelo animal. 3. Ensaio imunológico. I. Bohn, Thais Larré Oliveira, orient. II. Oliveira, Natasha Rodrigues de, coorient. III. Maia, Mara Andrade Colares, coorient. IV. Título.

CDD 599.3234

Laura de Vargas Maiocchi

Caracterização da atividade biológica de citocinas recombinantes de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*)

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 25/06/2025

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Thais Larré Oliveira Bohn (Orientadora)

(Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Dr.^a Bruna Silveira Pacheco

(Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Prof. Dr. Sergio Jorge

(Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária)

Dr.^a Mara Andrade Colares Maia (Suplente)

(Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Dr.^a Natasha Rodrigues de Oliveira

(Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

*Aos meus pais, Maria Helena e Sérgio,
dedico este trabalho.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por me guiar e me acompanhar durante toda a minha trajetória.

Aos meus pais, Maria Helena e Sérgio, por todo amor, carinho, apoio, incentivo e encorajamento, sem dúvidas são meus maiores exemplos de determinação, essa é mais uma das nossas conquistas! Nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui, me incentivando dia após dia, chegamos até aqui juntos e iremos conquistar muito mais.

Ao meu namorado Lucas, por todo incentivo e apoio durante essa trajetória.

À minha tia Marli, pelas ligações nos momentos difíceis e por comemorar comigo cada conquista. Teu apoio foi e é muito importante.

À minha avó Eroni, pelas bençãos, pinturas e conversas.

Aos meus irmãos, Serginho, Luiza e Dani, amo vocês.

Ao Paçoca, meu amado “cheetos” pelo amor e alegria imensa que me traz diariamente.

À professora Thaís, que além de uma orientadora excepcional, é uma pessoa incrível e amiga. Está sempre muito disposta a ensinar com muita dedicação e carinho.

Ao professor Odir, pela oportunidade e ensinamentos.

Aos colegas do lab 7, em especial à Natasha e Mara, por toda troca, ensinamentos e por estarem sempre dispostas a ensinar com muita dedicação e paciência, além da cobrança e confiança necessárias que foram confiadas à mim.

À Universidade Federal de Pelotas e aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia por proporcionarem um ensino gratuito e de qualidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada

*“Noé parecia um tolo, até que choveu.
Continue construindo”*

Resumo

MAIOCCHI, Laura de Vargas. **Caracterização da atividade biológica de citocinas recombinantes de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*)**. 2025, 50f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) tem se consolidado como modelo experimental em estudos de infecções, inflamação e câncer. No entanto, a escassez de reagentes imunológicos específicos representa uma limitação para o aprofundamento da caracterização imunológica nesse modelo. Este trabalho teve como objetivo analisar a atividade biológica das citocinas recombinantes rIL-6, rIL-10, rIFN- γ , rTGF- β e rTNF- α , produzidas em *Escherichia coli*, visando sua aplicação como insumos na composição de kits de detecção e desenvolvimento de ferramentas imunológicas para o hamster sírio. As proteínas foram expressas, purificadas, submetidas à remoção de endotoxinas e caracterizadas por SDS-PAGE e *Western blot*. A bioatividade foi avaliada por ensaio de viabilidade celular (MTT) em células CHO-K1 e pela análise da expressão gênica por RT-qPCR. O ensaio MTT demonstrou que, nas primeiras 24 horas, todas as citocinas - com exceção de rIFN- γ - promoveram efeito proliferativo significativo sobre as células CHO-K1. A partir de 48 horas, observou-se uma redução progressiva na viabilidade celular para todas as citocinas. A RT-qPCR revelou que o tratamento com rIL-6 reduziu significativamente a expressão de *tnf- α* , sem induzir a transcrição de *il-10*. A exposição a rIL-10 resultou na diminuição da expressão de *tnf- α* e *ifn- γ* , além de não ter induzido *il-6*. De forma semelhante, o tratamento com rTGF- β reduziu os níveis de *tnf- α* e *ifn- γ* , também sem detecção de *il-6* ou *il-10*. A estimulação com rIFN- γ levou à redução de *tnf- α* , mas não modulou significativamente a expressão de *tgf- β* , e tampouco induziu a transcrição de *il-6* ou *il-10*. Esses resultados demonstram que as citocinas recombinantes de hamster sírio dourado possuem atividade biológica funcional. Tais evidências reforçam o potencial dessas proteínas como ferramentas úteis para ensaios imunológicos, contribuindo para o desenvolvimento de reagentes específicos e para a ampliação da aplicabilidade do hamster sírio como modelo experimental em diversas áreas da pesquisa científica.

Palavras-chave: imunidade celular; modelo animal; ensaios imunológicos.

Abstract

MAIOCCHI, Laura de Vargas. **Characterization of the biological activity of recombinant cytokines from golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*)**. 2025, 50f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) has been established as a relevant experimental model for studies on infections, inflammation, and cancer. However, the limited availability of specific immunological reagents, such as those for cytokine detection, hampers the advancement of immunological characterization in this species. This study aimed to evaluate the biological activity of the recombinant cytokines rIL-6, rIL-10, rIFN- γ , rTGF- β , and rTNF- α , produced in *Escherichia coli*, with the objective of enabling their application as components of detection kits and immunological tools for the Syrian hamster. The proteins were expressed, purified, subjected to endotoxin removal, and characterized by SDS-PAGE and Western blotting. Biological activity was evaluated through a cell viability assay (MTT) in CHO-K1 cells and by gene expression analysis using RT-qPCR. The MTT assay revealed that within the first 24 h, all cytokines - except rIFN- γ - induced a significant proliferative effect on CHO-K1 cells. From 48 h onward, a progressive reduction in cell viability was observed for all cytokines. RT-qPCR analysis demonstrated that treatment with rIL-6 significantly downregulated *tnf- α* expression without inducing *il-10* transcription. Exposure to rIL-10 resulted in decreased expression of *tnf- α* and *ifn- γ* , and did not induce *il-6*. Similarly, treatment with rTGF- β reduced *tnf- α* and *ifn- γ* levels, also without detection of *il-6* or *il-10*. Stimulation with rIFN- γ led to a reduction in *tnf- α* , but did not significantly modulate *tgf- β* expression, nor did it induce transcription of *il-6* or *il-10*. Overall, these findings demonstrate that recombinant cytokines from the golden Syrian hamster exhibit functional biological activity. This evidence reinforces the potential of these proteins as valuable tools for immunological assays, contributing to the development of specific reagents and enhancing the applicability of the Syrian hamster as an experimental model across diverse fields of scientific research.

Keywords: cellular immunity; animal model; immunological assays.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Representação esquemática das interações entre citocinas pró e anti-inflamatórias.....22
- Figura 2:** Characterization of the recombinant proteins through SDS-PAGE 15% and Western Blot with anti-histidine monoclonal antibody.....33
- Figura 3:** Cell viability of CHO-K1 cells treated with different concentrations of recombinant proinflammatory cytokines rIL-6 **(A)**, rTNF- α **(B)** and rIFN- γ **(C)** (1,56 - 100 ng/ μ L) for 24 and 48 h, assessed by MTT assay.....35
- Figura 4:** Cell viability of CHO-K1 cells treated with different concentrations of recombinant anti-inflammatory cytokines rIL-10 **(A)** and rTGF- β **(B)** (1,56 - 100 ng/ μ L) for 24 and 48 h, assessed by MTT assay.....36
- Figura 5:** Relative expression of *tnf- α* , *ifn- γ* and *tgf- β* genes in CHO-K1 cells after stimulation with recombinant cytokines.....37

Lista de Tabelas

Tabela 1: Detailed primers and conditions used for real-time PCR assays.....	32
---	----

Lista de abreviaturas

CHO-K1 - *chinese hamsters ovary - k1* (linhagem celular K1 de ovário de hamster chinês)

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

IFN- γ – Interferon gama

IL- Interleucina

IgG - Imunoglobulina

mRNA – RNA mensageiro

PBS - *phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

qPCR – PCR quantitativo em tempo real

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

TGF- β – *Transforming growth fator beta* (Fator de crescimento transformador beta)

TNF- α – *Tumour necrosis factor alpha* (Fator de necrose tumoral alfa)

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Hipótese.....	15
2.2 Objetivo geral.....	15
2.3 Objetivos Específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Modelos animais na pesquisa científica.....	16
3.2 Hamster sírio dourado como modelo de pesquisa.....	18
3.3 Caracterização da resposta imune em hamsters.....	20
3.4 Citocinas como ferramentas para investigação da imunidade celular.....	22
3.5 Atividade biológica de citocinas recombinantes.....	24
4 CAPÍTULO.....	27
4.1 Manuscrito - Characterization of the biological activity of recombinant cytokines from golden Syrian hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	27
5 CONCLUSÃO GERAL.....	42
6 REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO GERAL

Citocinas são proteínas sinalizadoras de baixo peso molecular, essenciais na regulação da resposta imune. Produzidas por uma ampla variedade de células, como linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, essas moléculas exercem efeitos pleiotrópicos sobre outras células do sistema imune, modulando inflamação, proliferação celular, diferenciação e apoptose (LIU *et al.*, 2021). O equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ e IL-6, e citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , é determinante para o curso e a resolução de processos infecciosos e inflamatórios (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VERNEL-PAUILLAC & MERIEN, 2006; DAO *et al.*, 2023). Por essa razão, essas moléculas são amplamente utilizadas como ferramentas para caracterização da resposta imune em diversos modelos experimentais (ESPITIA *et al.*, 2010; ZIVCEC *et al.*, 2011).

A produção de citocinas na forma recombinante é uma alternativa viável e promissora para suprir a lacuna existente na disponibilidade de reagentes imunológicos em espécies experimentais menos convencionais. Essas proteínas recombinantes podem mimetizar a ação das citocinas naturais, sendo úteis em estudos de imunomodulação, sinalização celular e desenvolvimento de terapias (DAS *et al.*, 2022). No entanto, a aplicação funcional dessas proteínas depende de sua disponibilidade na forma recombinante com atividade biológica comprovada (ABDULL *et al.*, 2008; LARSEN, 2009). A ausência de citocinas específicas para determinadas espécies pode limitar significativamente a realização de ensaios imunológicos mais robustos. Este é o caso do hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*), que, embora venha ganhando destaque como modelo experimental em pesquisas envolvendo infecções, inflamação e câncer, ainda carece de reagentes imunológicos, como anticorpos e citocinas (VALENTINE *et al.*, 2012; MIEDEL & HANKENSON, 2015; WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER, 2017).

Diante dessa lacuna, nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Vacinologia da Universidade Federal de Pelotas, realizou em um trabalho anterior a produção das citocinas recombinantes IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- α e IFN- γ de hamster sírio dourado, utilizando *Escherichia coli* como sistema de expressão (PEDRA *et al.*, 2024). No entanto, a produção e caracterização bioquímica não garantem, por si só, que essas proteínas estejam funcionalmente ativas. A validação biológica é uma etapa crítica para assegurar que as citocinas recombinantes mantenham sua

capacidade de sinalização e interação com receptores celulares, requisito indispensável para sua aplicação em ensaio imunológico, como ELISA (LEE *et al.*, 2006; BIENVENU *et al.*, 1998). Nesse sentido, a avaliação funcional por meio de ensaios de viabilidade celular (MTT) e análise de expressão gênica por RT-qPCR torna-se uma estratégia eficaz para atestar a bioatividade dessas proteínas, sobretudo quando não há disponibilidade de anticorpos comerciais para detecção direta (ESPITIA *et al.*, 2010; OVERBERGH *et al.*, 2003).

Diante desse contexto, o presente trabalho visa analisar e caracterizar a atividade biológica das citocinas recombinantes IFN- γ , TGF- β , IL-6, IL-10 e TNF- α de hamster sírio dourado. Ao demonstrar sua funcionalidade, este estudo busca consolidar o uso dessas moléculas como insumos em ensaios imunológicos aplicados ao modelo animal de hamster, contribuindo para a ampliação de ferramentas experimentais disponíveis e fortalecendo a aplicabilidade deste modelo em pesquisas científicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Hipótese

Citocinas recombinantes de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) purificadas a partir de *Escherichia coli* como sistema de expressão procarioto apresentam atividade biológica.

2.2 Objetivo geral

Analisar e caracterizar a atividade biológica das citocinas recombinantes IFN- γ , TGF- β , IL-6, IL-10 e TNF- α de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*).

2.3 Objetivos Específicos

- Expressar as citocinas na forma recombinante usando *Escherichia coli* como sistema de expressão procarioto;
- Caracterizar a expressão das proteínas recombinantes por SDS-PAGE e *Western Blot*;
- Remover e quantificar endotoxinas nas amostras das proteínas;
- Analisar a proliferação celular da linhagem CHO-K1 através de MTT após estímulo com as citocinas recombinantes;
- Caracterizar a atividade biológica das citocinas de forma indireta através da análise do perfil de transcrição das citocinas reguladas pelas mesmas (IFN- γ , TGF- β , IL-6, IL-10 e TNF- α) por meio da técnica PCR de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Modelos animais na pesquisa científica

A utilização de animais na pesquisa científica iniciou na Grécia Antiga, quando Aristóteles usou modelos animais para compreender a anatomia e a fisiologia humana. Porém, foi nos séculos XVIII e XIX que seu uso se consolidou com experimentos conduzidos por cientistas como Lazzaro Spallanzani e Louis Pasteur, onde os modelos animais auxiliaram estudos sobre a origem da vida e doenças infecciosas (OPARIN, 1957). A partir do século XX, com o avanço da farmacologia e da biotecnologia, os modelos animais se tornaram indispensáveis para o desenvolvimento de medicamentos, dispositivos médicos e terapias, permitindo que pesquisadores avaliassem a eficácia e segurança de novos tratamentos antes de sua aplicação em humanos (BELMA *et al.*, 2019).

A relevância dos modelos animais na pesquisa científica está na sua capacidade de reproduzir aspectos fundamentais das doenças que acometem humanos e outras espécies, possibilitando estudos sobre fisiopatologia, toxicidade, mecanismos de ação de fármacos e desenvolvimento de vacinas. Espécies como camundongos, ratos, coelhos e primatas não humanos são amplamente utilizados devido à sua semelhança fisiológica e genética com os humanos (ANDERSEN & WINTER, 2017). Essa similaridade entre espécies não se limita apenas a aspectos biológicos comuns entre os mamíferos, mas também ao fato de que algumas doenças humanas acometem outras espécies animais. Isso é particularmente evidente não só para algumas doenças infecciosas, mas também se aplica a condições comuns, como diabetes tipo I, hipertensão e alergias. Estima-se que aproximadamente 90% dos medicamentos veterinários são idênticos ou muito similares aos utilizados em humanos, o que reforça a relevância translacional desses modelos (BARRÉ- SINOUSSE & MONTAGUTELLI, 2015).

As pesquisas com animais proporcionaram avanços significativos em diversas áreas da ciência, como a saúde veterinária e humana, reforçando seu valor científico. A maioria das vacinas, que imunizam e salvam milhares de vidas animais e humanas anualmente, foram desenvolvidas com sucesso utilizando modelos animais (BARRÉ- SINOUSSE & MONTAGUTELLI, 2015). O tratamento do diabetes

tipo I por insulina foi estabelecido pela primeira vez em cães por Banting e McLeod, que receberam o Prêmio Nobel em 1921 (DIEM, *et al.*, 2022). Apesar da importância desses modelos, realizar estudos envolvendo animais representa um desafio significativo, uma vez que a experimentação com animais demanda dos pesquisadores uma consideração ética que vai além do domínio técnico (COLBY *et al.*, 2017).

A prática de experimentação animal é regida pelo princípio dos 3Rs - *Replacement* (substituição), *Reduction* (redução) e *Refinement* (refinamento) - proposto por Russell e Burch em 1959, com o objetivo de promover o uso mais ético e responsável de animais em pesquisa. O princípio da substituição incentiva o uso de métodos alternativos sempre que possível, como culturas celulares. A redução visa minimizar o número de animais utilizados por meio de um planejamento experimental rigoroso, que garanta dados estatisticamente relevantes. Já o refinamento busca aprimorar técnicas e condições de manejo para minimizar o estresse, dor ou desconforto animal durante a experimentação (LIGUORI *et al.*, 2017; ANDERSEN & WINTER, 2017). Esses princípios têm sido amplamente incorporados por comitês de ética e legislações nacionais, como a do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e são fundamentais para garantir a condução de pesquisas com rigor científico, responsabilidade e respeito à vida animal (BRASIL, 2013).

A seleção de um modelo animal adequado exige uma compreensão detalhada da biologia e do comportamento da espécie a ser utilizada (ANDERSEN & WINTER, 2017). Para estudos em doenças infecciosas, essa seleção deve considerar a similaridade e reprodutibilidade do processo de estudo entre o modelo animal e a espécie hospedeira, considerando fatores como resposta imunológica, patogenia e transmissão do agente infeccioso (COLBY *et al.*, 2017). Além disso, deve-se considerar a disponibilidade de insumos, custo, tamanho do animal modelo, facilidade de manipulação, bem como segurança e ciclo reprodutivo (MUKHERJEE *et al.*, 2022; SARKAR & HEISE, 2019). Dentre os vários modelos experimentais, as culturas de células e tecidos têm destaque para pesquisas *in vitro* e animais de laboratório para pesquisas *in vivo*. Notavelmente, os animais desempenham um papel central na maioria das pesquisas laboratoriais, sendo bastante comuns os

estudos envolvendo ratos (*Rattus norvegicus* - Wistar), camundongos (*Mus musculus*) e hamsters (*Mesocricetus auratus*) (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Camundongos (*Mus musculus*) são amplamente empregados devido à disponibilidade de linhagens geneticamente modificadas e à vasta gama de reagentes imunológicos, sendo modelo padrão em estudos de imunopatogênese, vacinas e doenças autoimunes (ANDERSEN & WINTER, 2017; COLBY *et al.*, 2017). Ratos (*Rattus norvegicus*), por sua vez, são preferidos em pesquisas toxicológicas, cardiovasculares e neurocomportamentais, principalmente pela maior facilidade em manipulações cirúrgicas e farmacológicas (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005). Já o hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) têm se destacado como modelo alternativo em estudos infecciosos e oncológicos, devido à sua sensibilidade a determinados patógenos e características fisiológicas específicas que favorecem sua aplicação experimental (VALENTINE *et al.*, 2012; MIEDEL & HANKENSON, 2015; WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER, 2017). A escolha criteriosa entre esses modelos deve considerar não apenas a fisiopatologia da doença-alvo, mas também aspectos logísticos e disponibilidade de insumos específicos para cada espécie.

3.2 Hamster sírio dourado como modelo de pesquisa

Anteriormente à consolidação do hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental, o hamster chinês (*Cricetulus griséus*) desempenhou um papel fundamental na pesquisa de doenças infecciosas e em uma variedade de estudos epidemiológicos, como para leishmaniose e diabetes (FEENAY, 2012). No entanto, com o advento de técnicas de cultura de células, desenvolvidas nos últimos 50 anos, células derivadas deste animal têm desempenhado um papel muito importante na produção de proteínas terapêuticas glicosiladas e em ensaios de toxicidade citogenética. Com esses avanços, tornou-se desnecessária a realização de estudos *in vivo* com o hamster chinês, tornando muito produtiva a produção de proteínas recombinantes por meio da bioengenharia (JAYAPAL, 2007; FEENAY, 2012). Além disso, a manutenção desses animais apresentava dificuldades consideráveis, e sua

taxa de reprodução era limitada, exigindo importações frequentes da China para reposição das colônias (SANTOS, 2002).

Partindo disso, pesquisadores da Universidade de Jerusalém foram à Síria em busca de um modelo mais adequado de hamsters. Os animais encontrados e que sobreviveram, formaram colônias em laboratórios nos Estados Unidos e Europa. O hamster da espécie *Mesocricetus auratus* recebeu a denominação de “hamster sírio dourado” em referência à localização de origem, e em razão da coloração marrom-avermelhada de sua pelagem (SANTOS, 2002). O modelo se disseminou sendo utilizado inicialmente em estudos de reprodução, endocrinologia e microbiologia. O sucesso na adaptação e reprodução em cativeiro, aliado ao seu ciclo de vida curto, facilidade de manejo, comportamento dócil e tamanho reduzido (14 - 19 cm), favoreceu sua consolidação como modelo experimental padrão em diversas áreas da biomedicina (SANTOS, 2002; VALENTINE *et al.*, 2012).

Essa espécie se destaca entre os roedores laboratoriais por sua suscetibilidade natural a diversos patógenos, carcinógenos e distúrbios metabólicos. Além disso, apresenta uma resposta imunológica semelhante à observada em humanos (VALENTINE *et al.*, 2012; MIEDEL & HANKENSON, 2015). Um aspecto anatômico particularmente relevante é a presença das bolsas jugais - sacos musculares localizados nas bochechas - que além de sua função fisiológica de armazenamento de alimentos (WOLD & TOTH, 2012), possuem características histológicas semelhantes à pele humana. Essas bolsas são consideradas sítios imunologicamente privilegiados, o que as torna especialmente úteis como modelo para estudos de carcinogênese. Nesse contexto, o modelo de indução de tumores na bolsa jugal do hamster sírio tem sido amplamente empregado para investigar os mecanismos envolvidos na formação de neoplasias orais, sendo reconhecido como uma ferramenta clássica e eficaz para avaliação de agentes carcinógenos e de estratégias terapêuticas em oncologia experimental (HOCHMAN, *et al.*, 2004; VALENTINE *et al.*, 2012).

Devido a esses fatores, o hamster sírio dourado tem sido empregado em estudos sobre doenças infecciosas, incluindo bactérias, vírus e parasitos, como leptospirose e leishmaniose, bem como em modelos de doenças não transmissíveis, como o câncer (WAHL-JENSEN *et al.*, 2012; WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER,

2017). Durante a pandemia de COVID-19, ganhou destaque por sua suscetibilidade natural ao SARS-CoV-2, sem necessidade de modificação genética, tendo reproduzido sinais clínicos, carga viral e também lesões pulmonares compatíveis com aos observados em humanos (HUO *et al.*, 2021). Também, recentemente, a Fiocruz demonstrou sucesso com uma vacina experimental contra *Leishmania braziliensis* testada em hamsters, reforçando seu valor translacional na avaliação da eficácia de imunizantes (COUTO *et al.*, 2015).

Apesar das evidentes vantagens biológicas e experimentais, o hamster ainda é considerado um modelo relativamente novo em comparação a outros modelos amplamente utilizados nas pesquisas científicas, como camundongos e ratos (WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER, 2017). E com isso, sua utilização enfrenta limitações devido à escassez de reagentes imunológicos específicos e kits comerciais validados, o que restringe a aplicação de ensaios funcionais mais robustos. Em contrapartida, para outras espécies há maior disponibilidade de reagentes e tecnologias (WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER, 2017). Dessa forma, é esperado que o fortalecimento das pesquisas envolvendo o hamster sírio dourado contribua significativamente para o desenvolvimento de novas tecnologias e ferramentas específicas, ampliando ainda mais o potencial desse modelo experimental e consolidando sua aplicabilidade em diversas áreas.

3.3 Caracterização da resposta imune em hamsters

Um dos principais desafios enfrentados por pesquisadores que utilizam o hamster sírio como biomodelo reside na limitação de reagentes imunológicos específicos, como anticorpos e citocinas. Apesar de não representar uma preocupação significativa no estudo da progressão da doença e fisiopatologia, estes reagentes são cruciais no desenvolvimento de vacinas, medicamentos terapêuticos e na determinação de correlatos de proteção imunológica em doenças infecciosas (WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER, 2017).

No contexto da resposta imune humoral, que é mediada por anticorpos, os ensaios imunoenzimáticos como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

continuam sendo amplamente utilizados. Essa técnica permite detectar e quantificar anticorpos específicos, como IgM e IgG, em amostras biológicas. No entanto, a avaliação de subclasses como IgG3 permanece limitada, pois seus níveis basais são baixos e sua produção significativa ocorre apenas em linhagens específicas (COE; SCHELL; ROSS, 1995). A indisponibilidade de reagentes também se estende a outras classes importantes, como IgA, IgD e IgE, o que restringe a compreensão funcional das diferentes vias humorais envolvidas nas respostas imunes, especialmente para detecção das respostas de mucosa (WARNER; SAFRONETZ; KOBINGER, 2017).

Já no contexto da resposta celular, esta caracterização enfrenta limitações ainda mais severas. Diferentemente do modelo murino, para o qual há abundância de anticorpos monoclonais e painéis para citometria de fluxo, a maioria dos estudos com hamsters é restrita a quantificação da expressão gênica de efetores imunológicos ou PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Essa abordagem tem se mostrado a principal ferramenta para monitoramento da resposta imune celular, permitindo análises de genes de citocinas pró e anti-inflamatórias. Iniciativas como a de Zivcec *et al.* (2011), que desenvolveram painéis com primers para mais de 50 genes relacionados à imunidade, representaram importantes avanços. No entanto, o número de sequências genômicas disponíveis ainda é reduzido, o que dificulta a ampliação de estudos imunológicos mais específicos (ZIVCEC *et al.*, 2011).

A RT-qPCR, apesar de robusta, também possui limitações, como a presença de poucos genes de referência validados especificamente para hamsters (BUNDE *et al.*, 2024). A escolha de genes como *gapdh*, *actb* e *hprt* requer validação prévia, visto que esses genes, comumente tratados como universais, podem ter sua expressão afetada pelas condições experimentais avaliadas. Além disso, variações nas etapas de transcrição reversa e amplificação podem impactar diretamente a qualidade e reprodutibilidade dos dados (OVERBERGH *et al.*, 2003). Ainda, a correlação entre níveis de mRNA e proteínas expressas nem sempre é direta, o que dificulta inferências funcionais mais precisas. Para contornar algumas dessas limitações, recentemente nosso grupo de pesquisa, identificou e validou genes de referência para análise de expressão gênica relativa em amostras de hamster sírio dourado em

condições de vacinação e infecção por *Leptospira interrogans* (dados ainda não publicados).

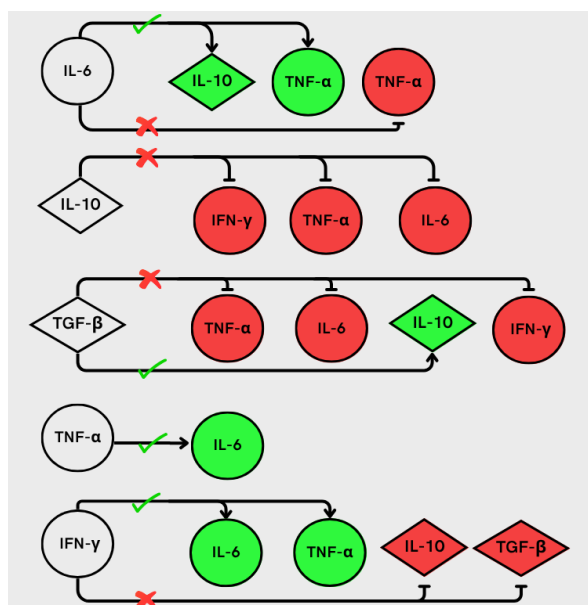
Adicionalmente, um estudo recente de Varma *et al.* (2022) ilustra bem os desafios metodológicos enfrentados nesse contexto. Ao desenvolverem uma vacina contra leptospirose utilizando hamsters como modelo de desafio, os autores optaram por conduzir os ensaios de caracterização imune em camundongos, justamente pela falta de reagentes específicos para hamsters. Mesmo com essa limitação, a eficácia da vacina foi validada no modelo de hamster, com os adjuvantes AS04 e Montanide ISA720VG gerando uma resposta imune robusta e duradoura, incluindo ativação de células T citotóxicas (CTLs), formação de centros germinativos e memória imunológica. Esse estudo reforça a importância de se investir no desenvolvimento de ferramentas moleculares e imunológicas para ampliar a aplicabilidade dos hamsters como modelo em imunologia experimental (VARMA *et al.*, 2022).

3.4 Citocinas como ferramentas para investigação da imunidade celular

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular que desempenham um papel central na comunicação intercelular durante a resposta imune. São produzidas por uma variedade de células, incluindo linfócitos T, macrófagos e células dendríticas, essas moléculas modulam o comportamento de outras células por meio da ligação a receptores específicos. Estas, são essenciais para o início e manutenção de processos inflamatórios, além de participarem da regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose (CURFS *et al.*, 1997).

As citocinas podem ser classificadas funcionalmente como pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Entre as pró-inflamatórias, destacam-se o fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6) e interferon gama (IFN- γ), responsáveis pela ativação de células imunes e amplificação da resposta inflamatória. As anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), facilitam a regressão da inflamação e a recuperação das fases agudas (VERNEL-PAUILLAC; MERIEN, 2006). A interação entre essas moléculas ocorre em redes complexas e definem o resultado final da resposta imune (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática das interações gerais entre citocinas pró e anti-inflamatórias (em variados tipos celulares). As setas indicam estímulo da expressão de citocinas, enquanto que o símbolo "⊣" representa efeito inibitório. Citocinas representadas por círculos correspondem a pró-inflamatórias, enquanto as representadas por losangos são anti-inflamatórias.



Fonte: Elaboração própria.

A IL-6, por exemplo, pode tanto estimular a inflamação quanto induzir a expressão de IL-10, evidenciando uma funcionalidade dupla (PARANGA *et al.*, 2024), além de regular a expressão de TNF- α , modulando assim o equilíbrio entre as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias (CURFS *et al.*, 1997; DAO *et al.*, 2023). Já a IL-10 exerce efeito inibitório sobre diversas citocinas pró inflamatórias, principalmente IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1992), TNF- α e IL-6, regulando o equilíbrio imunológico e evitando respostas excessivas que possam resultar em danos teciduais (BATISTA JÚNIOR *et al.*, 2010; VERNEL-PAUILLAC & GOARANT, 2010).

O TGF- β desempenha um papel essencial na modulação da resposta imune, atuando como citocina anti-inflamatória ao induzir a diferenciação de células T reguladoras (Tregs). Essas células, que são responsáveis por suprimir a ação inflamatória de mediadores como IL-6 e TNF- α , também pode induzir a produção de IL-10 por meio da diferenciação dessas células reguladoras, reforçando o ambiente imunossupressor (LI *et al.*, 2006; VERNEL-PAUILLAC & GOARANT, 2010; CHEN,

2023). Essa citocina também pode limitar a atividade do IFN- γ em determinados contextos inflamatórios (GAZZINELLI *et al.*, 1992; CHEN, 2023). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune. Estudos demonstram que o TNF- α pode induzir a expressão de diversas outras citocinas e moléculas inflamatórias, incluindo a IL-6 (YAN *et al.*, 2018). Por outro lado, o IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que estimula a produção de IL-6 e TNF- α , além de ativar macrófagos e células T citotóxicas. Também pode inibir os efeitos imunossupressores das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , promovendo uma resposta inflamatória mais intensa (BEUTLER & CERAMI, 1989; CURFS *et al.*, 1997; IVASHKIV *et al.*, 2014).

A quantificação do perfil de citocinas tem sido amplamente empregada em modelos animais para caracterização da resposta imune, principalmente na avaliação da eficácia de vacinas (BUNDE *et al.*, 2023), imunoterapias e modelos de infecção (ZIVCEC *et al.*, 2011). Em roedores como camundongos e ratos, essa caracterização é realizada por meio de ELISA, citometria de fluxo ou PCR em tempo real. No entanto, para o hamster sírio, a principal abordagem viável tem sido a quantificação de mRNA por RT-qPCR, devido à escassez de insumos proteômicos específicos para a espécie (ESPITIA *et al.*, 2010; ZIVCEC *et al.*, 2011). Embora alguns estudos tenham testado anticorpos desenvolvidos para detecção de citocinas de outros roedores, observou-se reatividade cruzada limitada, o que compromete a confiabilidade para monitorar e quantificar proteínas envolvidas na resposta imune de hamsters (ZIVCEC *et al.*, 2011). Apesar de ser uma técnica indireta, a RT-qPCR é sensível e permite avaliar de forma funcional a bioatividade das citocinas. Ela é particularmente útil para validar a resposta biológica a estímulos imunológicos, sendo aplicada em estudos que envolvem produção de citocinas recombinantes e análise de vias sinalizadoras (ESPITIA *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2020).

3.5 Atividade biológica de citocinas recombinantes

A produção de citocinas na forma recombinante é uma alternativa que pode viabilizar novos reagentes para a análise da resposta imune no modelo animal de hamster. O aspecto biológico das citocinas e seus caracteres duplos

(imunostimuladores e imunossupressores) são apropriados para diferentes aplicações médicas (DAS *et al.*, 2022). Essas moléculas poderiam mimetizar as citocinas naturais, sendo aplicadas para imunomodulação, desenvolvimento de terapias imunológicas e estudos de sinalização celular. Além disso, podem ser utilizadas como insumos na produção de anticorpos específicos, empregados em kits de detecção de citocinas, bem como servir como controles nestes kits. A capacidade de produzir essas proteínas com controle sobre sua pureza e concentração oferece uma ferramenta forte para entender como diferentes estímulos podem modular a resposta imune (AUNG *et al.*, 2023).

A expressão de proteínas heterólogas em organismos hospedeiros procarióticos é frequentemente escolhida como ponto inicial em estudos biotecnológicos devido à facilidade de manipulação, rápido tempo de geração e estabelecimento sólido como sistemas de expressão (LARSEN, 2009). O sistema de expressão heteróloga de *Escherichia coli* é bastante conhecido por ser uma técnica fácil, rápida e barata para expressão de proteínas recombinantes. Essas características, aliadas ao conhecimento bem avançado sobre *E. coli* e ao alto nível de experiência com a expressão de genes, estabeleceram esse sistema como o principal organismo hospedeiro para grande parte das aplicações científicas em expressão de proteínas (ABDULL *et al.*, 2008).

Entretanto, a utilização da *E. coli* como hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas não está isenta de desafios. Esse sistema apresenta limitações significativas que podem comprometer a produção de proteínas funcionais. Uma das principais desvantagens é a ausência de modificações pós-traducionais complexas, como a glicosilação, essenciais para a atividade e estabilidade de muitas proteínas eucarióticas (INCIR & KAPLAN, 2024). Além disso, a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* frequentemente resulta na formação de corpos de inclusão - agregados insolúveis de proteínas mal dobradas - que requerem etapas adicionais de solubilização e dobramento, muitas vezes com baixa eficiência. A presença de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa da bactéria também representa um desafio, pois essas endotoxinas devem ser rigorosamente removidas durante a purificação para aplicações terapêuticas. Portanto, embora *E. coli* seja um sistema de expressão valioso, suas limitações

devem ser cuidadosamente consideradas no planejamento de estratégias de produção de proteínas recombinantes (HAYAT *et al.*, 2018).

Diante dessas limitações, torna-se importante validar a bioatividade de citocinas produzidas de forma recombinante através de bioensaios, prática comumente adotada por empresas que comercializam essas proteínas de outros modelos animais. Estes bioensaios são comumente realizados via testes de proliferação celular utilizando o reagente brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT), e a atividade da proteína é estabelecida por meio da determinação da concentração de proteína capaz de induzir 50% de crescimento celular (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2025). O ensaio de proliferação celular MTT é um sistema de ensaio colorimétrico que mede a redução de um componente tetrazólio (MTT) em um produto insolúvel de formazan pelas mitocôndrias de células viáveis (ABDULL *et al.*, 2008).

A validação da atividade biológica de proteínas recombinantes, como as citocinas, é uma etapa essencial para garantir sua funcionalidade e eficácia em aplicações experimentais e terapêuticas. Embora técnicas como o ensaio MTT ofereçam uma medida indireta da bioatividade por meio da análise da viabilidade celular, a caracterização funcional pode ser complementada com a análise da expressão gênica por RT-qPCR, especialmente quando não há disponibilidade de reagentes proteicos específicos. Essa abordagem foi empregada por Liu *et al.*, (2020), que realizaram a expressão heteróloga de IL-25 humana em *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*), seguida de purificação e caracterização funcional da proteína recombinante. A atividade biológica foi avaliada com base na indução de genes-alvo por RT-qPCR, demonstrando a eficácia da citocina produzida e reforçando a utilidade desta metodologia para validação funcional.

A utilização combinada de RT-qPCR e bioensaios celulares permite a avaliação da capacidade de uma citocina induzir a expressão de marcadores imunológicos específicos ou até mesmo citocinas correlacionadas, oferecendo uma leitura funcional mais robusta da sua atividade biológica. Assim, ao integrar essas abordagens em modelos como o hamster sírio, é possível superar limitações impostas pela escassez de reagentes comerciais e avançar na caracterização da resposta imune de forma eficiente e confiável.

4 CAPÍTULO

4.1 Manuscrito - Characterization of the biological activity of recombinant cytokines from golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*)

Laura de V. Maiocchi¹; Natasha R. de Oliveira¹, Mara A. C. Maia¹; Ana C. K. Pedra¹; Tiffany T. Bunde¹; Beatriz C. M. Santos¹; Odir A. Dellagostin¹; Thaís L. O. Bohn^{1#}

¹Laboratório de Vacinologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

#Corresponding author: thais.larre@ufpel.edu.br

Manuscrito a ser submetido na forma de “Brief Report” à revista Molecular Biology Reports (Fator de impacto: 2.6)

ABSTRACT

Background: The analysis of cellular immunity in Syrian hamsters has been limited by the lack of species-specific immunological reagents, particularly for cytokine detection. To address this, we aimed to characterize the biological activity of recombinant cytokines IFN- γ , TGF- β , IL-6, IL-10 and TNF- α from Syrian hamsters, previously produced in *Escherichia coli*, to support their application in immunodiagnostic tools. **Methods and Results:** Recombinant cytokines were expressed in *E. coli*, purified, detoxified and characterized by SDS-PAGE and Western blot. Their biological activity was assessed by MTT cell viability assay and RT-qPCR gene expression analysis in CHO-K1 cells. The MTT assay demonstrated that all cytokines, except rIFN- γ , induced significant proliferative effects in the first 24 h. Conversely, rIFN- γ reduced cell viability dose-dependently from the lowest concentrations. From 48 h onwards, all cytokines progressively decreased cell viability. RT-qPCR analysis revealed that rIL-6 significantly downregulated *tnf- α* without inducing *il-10*, while rIL-10 and rTGF- β decreased *tnf- α* and *ifn- γ* expression, with no detection of *il-6* or *il-10*. Stimulation with rIFN- γ led to *tnf- α* downregulation but did not significantly modulate other cytokine genes. **Conclusions:** The recombinant Syrian hamster cytokines exhibit functional biological activity, modulating cell viability and immune-related gene expression. These findings support their application in immunological assays and contribute to expanding the immunological toolkit for Syrian hamster research.

KEYWORDS: cellular immunity, animal model, immunological assays.

INTRODUCTION

Animal models have been crucial for advancing biomedical research, helping to understand physiology, pathology and develop therapies. The golden Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) is a versatile model used mainly in infectious disease and inflammatory studies, as well as in oncology and immunology, due to its pathogen susceptibility and immune response similarities to humans (1, 2). However, the lack of specific immunological reagents, such as validated cytokines and antibodies, limits deeper immunological analyses in this species (3).

Cytokines regulate immune responses and are essential tools for studying inflammation and immunomodulation. Pro-inflammatory cytokines like TNF- α , IL-6, and IFN- γ activate and recruit cells during infections and tissue damage (4, 5, 6). Anti-inflammatory cytokines such as TGF- β and IL-10 regulate cell proliferation and promoting inflammation resolution (7, 8). The absence of recombinant Syrian hamster-specific cytokines hinders functional studies and the validation of immunoassays like ELISA or bioassays (9, 10).

Commercial cytokine detection kits exist for common models like mice and rats but are scarce for Syrian hamsters, limiting method standardization and immune response interpretation (10). Producing and characterizing recombinant cytokines with confirmed identity and biological activity would enable their use in functional assays and in developing specific immunological tools, such as antibodies and diagnostic kits, expanding the hamster's research applications (11).

This study evaluated the biological activity of recombinant Syrian hamster cytokines rIL-6, rIL-10, rIFN- γ , rTGF- β , and rTNF- α , previously produced in *Escherichia coli* (12), using CHO-K1 cells via MTT assay and RT-qPCR. Validating these proteins' bioactivity supports the development of immunodiagnostic tools for this model, broadening its use in cellular immunity research.

MATERIALS AND METHODS

Production of Recombinant Cytokines: Initially, proteins were expressed as described by Pedra *et al.*, 2024 (12). For the recovery of insoluble proteins (contained in inclusion bodies), an in-house protocol was used, including steps of cell fractionation, washing, and solubilization. Briefly, pellets were solubilized in lysis buffer containing 100 mM Tris HCl; 10 mM Imidazole; pH 7.0, supplemented with 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 100 μ g/mL lysozyme, with incubation for 30 minutes under agitation, followed by cooling and sonication. After centrifugation, the supernatant was stored and the pellet was washed three times with a buffer containing 100 mM Tris HCl; 5 mM disodium EDTA; 2 M urea; 2% Triton X-100; pH 7.0, with sonication and centrifugation at each cycle. Then, the pellet was solubilized in a buffer with N-lauroylsarcosine, sonicated again and centrifuged.

For the proteins rTGF- β , rIFN- γ and rTNF- α , a second solubilization was performed in a buffer with 8 M urea and imidazole, repeating the same processes. The proteins were dialyzed against PBS buffer with decreasing concentrations of urea and N-lauroylsarcosine. Endotoxin residues were removed using the Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Spin Columns, 0.25 mL (Thermo Fisher, Brazil). The product was sterilized by filtration using a 0.22 μ m filter. Endotoxin quantification was performed with the Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit (Thermo Fisher, Brazil). The concentration of each recombinant cytokine was then determined using the BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, Brazil), according to the manufacturer's instructions. Protein expression, identity and endotoxin removal were confirmed using 15% SDS-PAGE and Western blot, employing anti-6xHis monoclonal antibody.

Cell Culture: Endotoxin-free recombinant cytokines were used to stimulate CHO-K1 cell line cultures. Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – low glucose (Sigma-Aldrich, Brazil), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Brazil), at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere and 95% humidity.

MTT Assay for Cell Viability: Cell viability was determined using the MTT assay, which evaluates the relative percentage of metabolically active cells compared to untreated cells. Briefly, CHO-K1 cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well. After 24 h of incubation, the cells were treated with recombinant proteins rIL-6, rIL-10, rTGF- β , rIFN- γ , and rTNF- α at four different concentrations, ranging from 1,56 ng/ μ L to 100 ng/ μ L, and incubated for 24 and 48 h. Cells incubated with DMEM only were used as negative controls, and Concanavalin A (10 μ g/mL) was employed as an internal positive control for cell proliferation. The absorbance of the colored product was measured at 562 nm using a microplate reader. Cell viability (%) was calculated according to the formula: Viability (%) = (Mean absorbance of treated cells / Mean absorbance of control cells) $\times$ 100. Statistical analysis of the cell viability data was conducted by two-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's post-hoc test to identify significant differences between groups, using the Statistix 10.0 package. Graphs were generated using GraphPad Prism 8.0.

Cytokine Stimulation and RNA Extraction: To evaluate the biological activity of the cytokines through gene expression analysis, two independent experiments were performed. Cells from the same CHO-K1 lineage were seeded in 24-well plates at a concentration of 2×10^5 cells per well in DMEM culture medium. After 24 h of incubation, the cells were treated and incubated for 6 h with 25 ng of each recombinant protein, in duplicate. Subsequently, total RNA was extracted using the commercial PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

cDNA Synthesis and Quantitative Real-Time PCR Assay: cDNA synthesis was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions, using 1000 ng of RNA. Quantitative real-time PCR (qPCR) was carried out on the QuantStudio 5 system (Applied Biosystems, Waltham, USA) to assess the relative mRNA transcription levels of the genes encoding the following cytokines: interleukin-10 (IL-10), interleukin-6 (IL-6), interferon-gamma (IFN- γ), transforming growth factor-beta (TGF- β), and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Table 1) (13, 14, 15). The *gapdh* gene was used as an endogenous reference control. qPCR reactions were performed using the GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) with 0.5 μ M primers for *il-10*, *tgf- β* , and *ifn- γ* , and 0.3 μ M primers for *il-6* and *tnf- α* . All samples were analyzed in duplicate. The comparative threshold cycle method ($\Delta\Delta C_t$) was used to determine the relative mRNA levels for each gene.

Table 1: Detailed primers and conditions used for real-time PCR assays.

Cytokine gene	Primer sequence	Annealing temp (°C)	Efficiency	Reference
<i>il-6</i>	F: CAACCCTGGCTGTATGGACA R: GTGCTCTGAATGACTCTGGCT	60	1.9	(13)
<i>il-10</i>	F: TGGACAACATACTACTCACTG R: GATGTCAAATTCATTCATGGC	60	1.8	(13)
<i>tgf-β</i>	F: ACGGAGAAGAACTGCT R: ACGTAGTACACGATGGG	60	1.8	(13)
<i>tnf-α</i>	F: AACGGCATGTCTCTCAA R: AGTCGGTCACCTTTCT	60	1.8	(13)
<i>ifn-γ</i>	F: GACAACCAGGCCATCC R: CAAAACAGCACCGACT	60	1.8	(13)

<i>gapdh</i>	F: GGTGGAGCCAAGAGGTCAT R:GGTTCACACCCATCACAAACAT	60	1.93	(14)
--------------	--	----	------	------

Source: Self-made.

All experiments were performed in duplicate, and the data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The results were subjected to statistical analysis using the paired t-test, considering $p < 0.05$ as statistically significant, with GraphPad Prism software.

RESULTS AND DISCUSSION

Production and characterization of recombinant cytokines: The expression of recombinant cytokines and the efficiency of endotoxin removal were successful. Western blot analysis using an anti-histidine antibody confirmed the identity of the recombinant proteins. Figure 2 shows the bands corresponding to the cytokines rIL-6, rIL-10, rTGF- β , rTNF- α , and rIFN- γ , with the expected molecular weights of 22.9 kDa, 19.8 kDa, 11.8 kDa, 22.3 kDa, and 18.9 kDa, respectively. Additionally, bands compatible with dimers were observed for rIL-6, rIL-10, and rIFN- γ , suggesting proper structural conformation and potential biological functionality, as oligomerization is essential for receptor activation and intracellular signaling. According to Baneyx and Mujacic (2004), the formation of such oligomeric structures is directly associated with correct folding of recombinant proteins in *E. coli*, which is crucial for their activity. Therefore, the presence of dimers indicates that the recombinant proteins likely retain appropriate folding and functional potential (5).

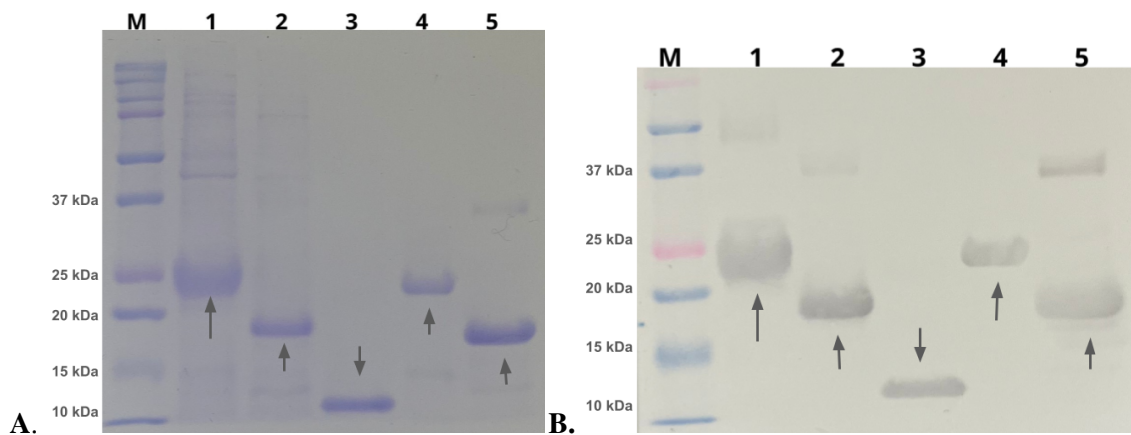


Figure 2: Characterization of the recombinant proteins through SDS-PAGE 15% and Western Blot with anti-histidine monoclonal antibody. **A: SDS-PAGE:** M- Molecular weight marker (Bio-Rad); 1-rIL-6; 2-rIL-10; 3-rTGF- β ; 4-rTNF- α ; 5- rIFN- γ . **B: Western Blot:** M- Molecular weight marker (Bio-Rad); 1-rIL-6; 2-rIL-10; 3-rTGF- β ; 4-rTNF- α ; 5- rIFN- γ .

Endotoxin removal from the recombinant protein preparations was successful, with levels below 0.1 EU/mL. According to the European Pharmacopoeia (2004), acceptable limits vary by use and route of administration; for instance, intravenous products should contain less than 5.0 EU/kg/h (16). Although these cytokines were not intended for *in vivo* use, the low endotoxin levels ensured that *in vitro* assays were free from LPS interference, confirming that the observed cellular responses were solely due to the cytokines.

Cell viability analysis: During the first 24 h, all recombinant cytokines — rIL-6 (Figure 3A), rTNF- α (Figure 3B), rIL-10 (Figure 4A) and rTGF- β (Figure 4B)— stimulated CHO-K1 cell proliferation compared to the untreated control (100%), indicating a significant proliferative effect ($p < 0.05$). In contrast, rIFN- γ (Figure 3C) reduced cell viability at all tested concentrations, with statistically significant reductions observed from 25 ng/ μ L onward in 24 h ($p < 0.05$). At 48 h, a general decline in cell viability was observed for all cytokines comparing with same concentration in 24 h ($p < 0.05$). However, only cells treated with rIFN- γ reached viability levels below 70% after 48 h, presenting a cytotoxic effect according to ISO 10993-5:2009, which states that reductions in cell viability equal to or greater than 30% in cytotoxicity assays should be considered toxic (17). This profile is consistent with the findings of Schmiegel et al. (1988), who reported a significant antiproliferative effect of IFN- γ in human tumor cell lines, reinforcing its time-dependent cytotoxic potential (18).

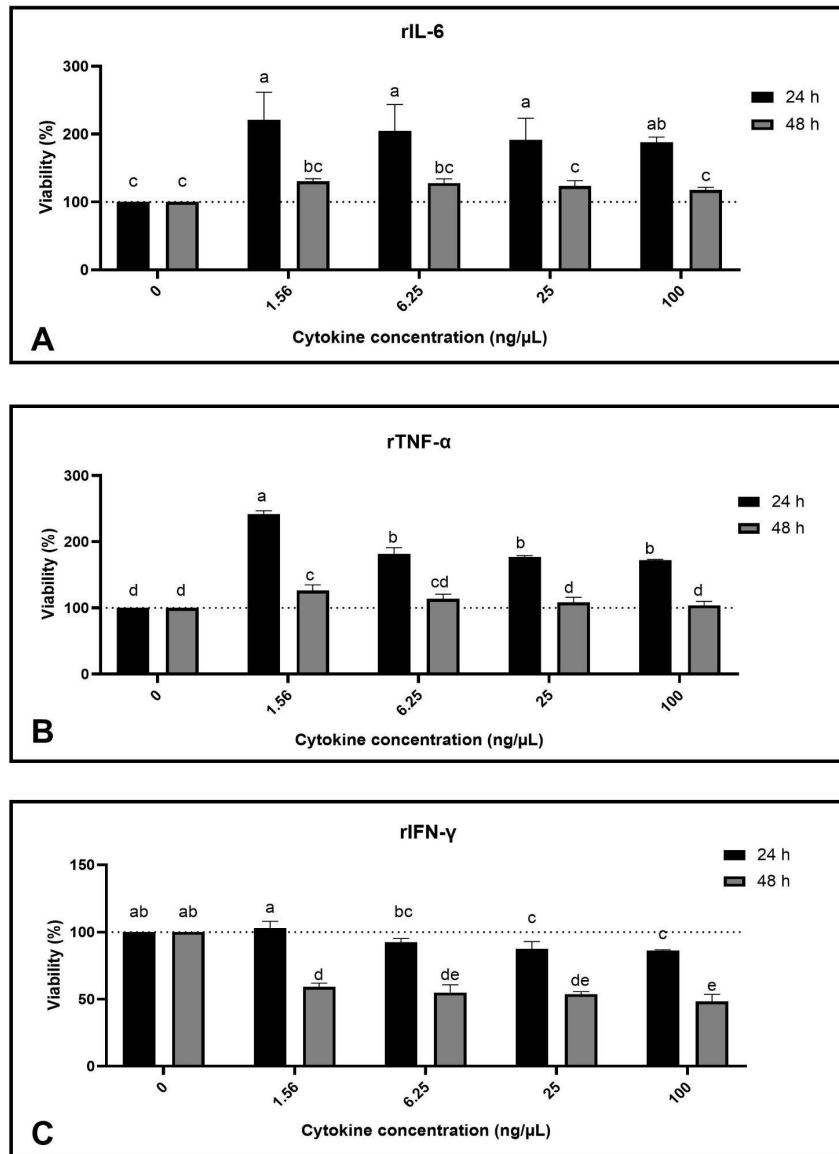


Figure 3. Cell viability of CHO-K1 cells treated with different concentrations of recombinant proinflammatory cytokines rIL-6 (A), rTNF- α (B), and rIFN- γ (C) (1,56 - 100 ng/ μ L) for 24 and 48 h, assessed by MTT assay. Results are expressed as percentage relative to the negative control (untreated cells, dotted line). Bars represent the mean $\pm$ standard deviation of two independent experiments performed in duplicate. Different letters indicate statistically significant differences between groups ($p < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's test).

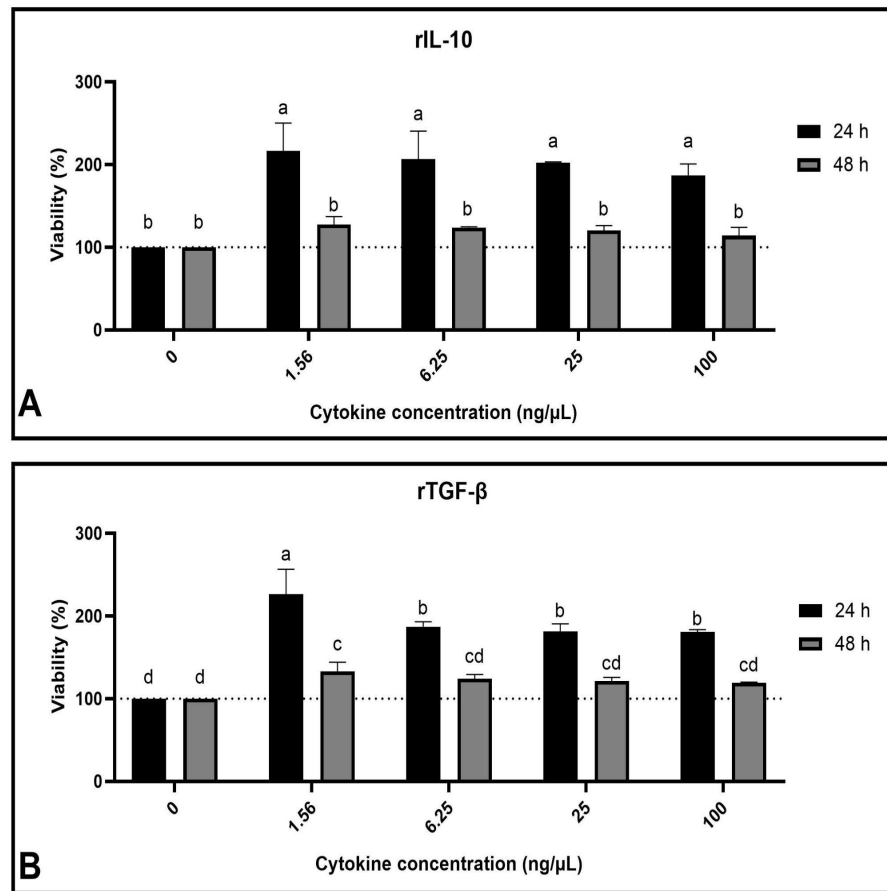


Figure 4. Cell viability of CHO-K1 cells treated with different concentrations of recombinant anti-inflammatory cytokines rIL-10 (**A**) and rTGF-β (**B**) (1,56 - 100 ng/μL) for 24 and 48 h, assessed by MTT assay. Results are expressed as percentage relative to the negative control (untreated cells, dotted line). Bars represent the mean ± standard deviation of two independent experiments performed in duplicate. Different letters indicate statistically significant differences between groups ($p < 0.05$; ANOVA followed by Tukey's test).

Gene Expression Analysis after cytokine stimulation in CHO-K1 cells: The biological activity of recombinant cytokines was assessed by indirect quantification of gene expression in CHO-K1 cells stimulated with the respective proteins (Figure 5). Treatment with rIL-6 (Figure 5A) led to a significant reduction in *tnf-α* expression ($p < 0.05$), indicating an immunomodulatory effect after 6 h of stimulation, in agreement with studies demonstrating that IL-6 can inhibit TNF-α production in monocytes and cell lines such as U937 (19). Similarly, exposure of cells to rIL-10 (Figure 5B) resulted in a marked decrease in the expression of *tnf-α* ($p < 0.05$) and *ifn-γ* ($p < 0.01$), reinforcing the known anti-inflammatory profile of this cytokine, widely described as transcription inhibitor of pro-inflammatory genes (20). Treatment with rTGF-β (Figure 5C) also induced a significant reduction in the expression of *tnf-α* ($p < 0.05$) and *ifn-γ* ($p < 0.05$), reinforcing its immunosuppressive action (21,

22). On the other hand, stimulation with rIFN- γ (Figure 5D) did not promote significant changes in the expression of *tnf- α* and *tgf- β* ($p > 0.05$), suggesting the absence of transcriptional feedback under the conditions tested (23). Treatment with rTNF- α did not promote detectable expression of any cytokine transcripts evaluated (*il-6*, *il-10*, *ifn- γ* or *tgf- β*), suggesting the absence of transcriptional response in this experimental model to stimulation with this cytokine. Moreover, no amplification of *il-10* was observed in samples treated with rIL-6, rIFN- γ or rTGF- β , nor of *il-6* in cells stimulated with rIL-10, rIFN- γ or rTGF- β . The absence of *Ct* in these conditions indicates that there was no detectable gene expression, reinforcing the specificity of the transcriptional responses induced by each recombinant cytokine.

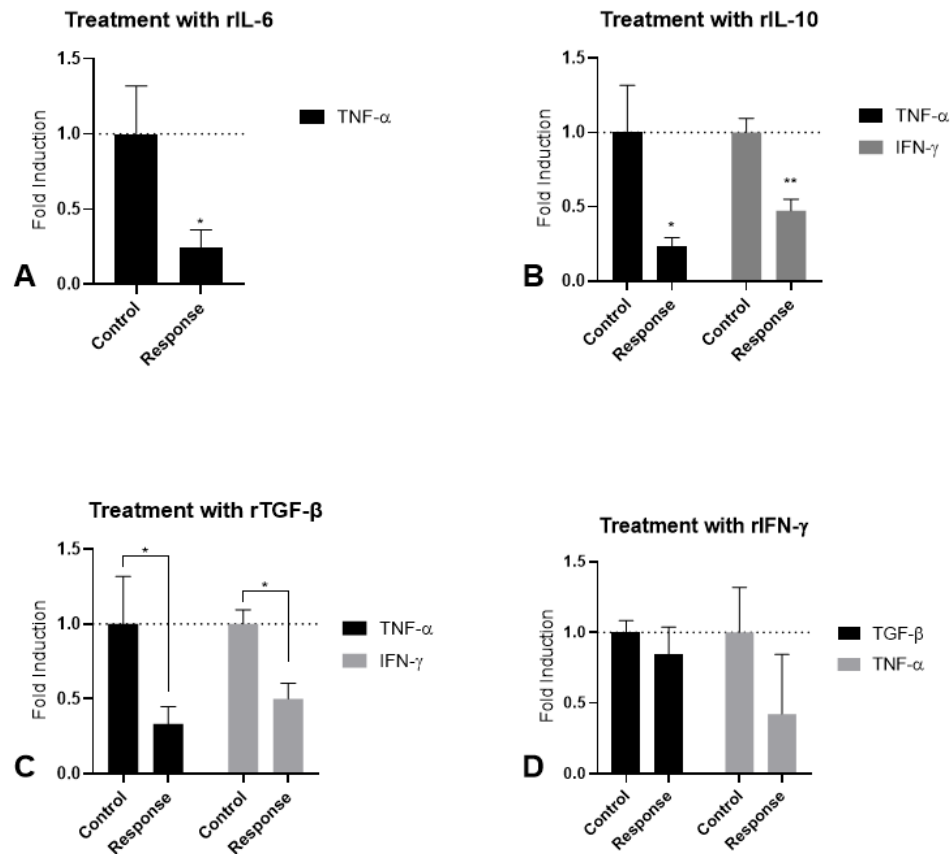


Figure 5. Relative expression of *tnf- α* , *ifn- γ* , and *tgf- β* genes in CHO-K1 cells after stimulation with recombinant cytokines. Cells were stimulated with rIL-6 (A), rIL-10 (B), rTGF- β (C), or rIFN- γ (D), and gene expression was analyzed by quantitative PCR using the $\Delta\Delta C_t$ method. Expression levels were normalized to *gapdh* and are presented as fold induction relative to the control group (set to 1; dotted line). Bars represent the mean $\pm$ standard deviation of two independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences compared to the control group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; paired t-test).

In this study, cell viability was assessed using the MTT assay at two time points (24 and 48 h), with the highest viability observed within the first 24 h. However, RNA extraction was performed after 6 h of stimulation, based on the typical kinetics of transcriptional responses to external stimuli such as cytokines, which usually occur between 4 and 8 h (6, 7), as also reported by Martin et al. (2007) (24). RT-qPCR results revealed changes in the expression of target genes in response to recombinant cytokines, suggesting their functional biological activity, even in a non-immune cell system.

The CHO-K1 cell line was chosen as the in vitro model due to its phylogenetic compatibility with the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*), as it is derived from the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*) (10). This cell line is well established in the production of recombinant protein in mammals and offers technical advantages such as easy cultivation, rapid proliferation, and phenotypic stability. Although its ability to respond to immunological stimuli is limited - since non-immunocompetent cells may express low or absent levels of specific cytokine receptors (11) - this limitation did not prevent the detection of significant transcriptional responses to recombinant cytokines in the present study. This highlights the usefulness of this system as an initial platform for validation of bioactivity, without disregarding the importance of future assays in more representative immune cell models.

The use of primary cultures of hamster immune cells may provide greater biological representation of the response. However, this approach has considerable limitations, such as low reproducibility, short in vitro lifespan, and difficulties in standardization between experiments, since each cell isolation is unique (25). In addition, the limited availability of Syrian hamsters for experimental use – due to ethical and logistical constraints – further restricts the feasibility of generating primary immune cultures on a larger scale. Despite not employing an immune-competent in vitro model, the results obtained in this study demonstrate that the CHO-K1 cell line is a valid and effective platform for the initial assessment of the biological activity of recombinant cytokines. The observed transcriptional responses confirm the functionality of the produced proteins and reinforce the potential of this system for preliminary validation of immunomodulatory effects.

CONCLUSION

Recombinant rIL-6, rIL-10, rTGF- β , rTNF- α , and rIFN- γ produced in *E. coli* demonstrated functional biological activity in CHO-K1 cells, altering cell viability and modulating gene expression. The results indicate correct protein folding and bioactivity, suitable for use in immunological studies and diagnostic tool development for the Syrian hamster. Validation of these recombinant cytokines paves

the way for standardizing protocols and specific kits, expanding the Syrian hamster's potential as an experimental model in immunological and pharmacological research.

REFERENCES:

1. MIEDEL, E. L.; HANKENSON, F. C. Chapter 5 - Biology and Diseases of Hamsters. **Laboratory Animal Medicine: Third Edition**. [s.l: s.n.]. p. 209–245, 2015.
2. VALENTINE, H.; DAUGHERITY, E.K.; SINGH, B.; MAURER, K.J. The Experimental Use of Syrian Hamsters. 1st ed., **Elsevier Inc.**, 2012.
3. WARNER, B.M.; SAFRONETZ, D.; KOBINGER, G.P. Syrian Hamsters as a Small Animal Model for Emerging Infectious Diseases: Advances in Immunologic Methods. **Adv Exp Med Biol**. v. 972, p. 87-101, 2017.
4. ESPITIA, C. M. et al. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. **BMC immunology**, v. 11, p. 31, 2010.
5. BANEYX, François; MUJACIC, Mirna. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399-1408, 2004.
6. GALLEGO ROMERO, Irene et al. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. **BMC biology**, v. 12, p. 1-13, 2014.
7. BALSALOBRE, Aurélio; DAMIOLA, Francesca; SCHIBLER, Ueli. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell**, v. 93, n. 6, p. 929-937, 1998.
8. ZIVCEC, Marko 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.
9. LEE, Jai-Wei et al. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 219-229, 2006.
10. JAYAPAL, Karthik P. et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. **Chemical engineering progress**, v. 103, n. 10, p. 40, 2007.
11. WURM, Florian M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393-1398, 2004.

12. PEDRA, Ana CK et al. Production of recombinant cytokines and polyclonal antibodies for analysis of cellular immune response in golden Syrian hamster. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 1012, 2024.
13. VERNEL-PAUILLAC, Frédérique; GOARANT, Cyrille. Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 1, p. e582, 2010.
14. WUNDER JR, Elsie A. et al. Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. **Infection and immunity**, v. 84, n. 7, p. 2105-2115, 2016.
15. OVERBERGH, Lutgart et al. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. **Journal of biomolecular techniques: JBT**, v. 14, n. 1, p. 33, 2003.
16. EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5. ed., Strasbourg, Council of Europe, v. 1, p. 161-168, 2004.
17. International Organization for Standardization ISO 10993-5: 2009. **Biological Evaluation of Medical Devices** – Part 5: Tests for in Vitro cytotoxicity.
18. SCHMIEGEL, W. H. et al. Antiproliferative Effects Exerted by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) and Interferon- γ (IFN- γ) on Human Pancreatic Tumor Cell Lines. **Pancreas**, v. 3, n. 2, p. 180-188, 1988.
19. ADERKA, Dan; LE, J. M.; VILCEK, J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 143, n. 11, p. 3517-3523, 1989.
20. MOORE, Kevin W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, v. 19, n. 1, p. 683-765, 2001.
21. LANGERMANS, J. A. M. et al. Transforming growth factor- β suppresses interferon- γ -induced toxoplasmastatic activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor- α production. **Parasite immunology**, v. 23, n. 4, p. 169-175, 2001.
22. XIA, Yuhan et al. Reciprocal suppression between TGF β signaling and TNF stimulation finetunes the macrophage inflammatory response. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 38, n. 13, p. e23704, 2024.

23. SCHRODER, Kate et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.
24. MARTIN, Samuel AM et al. Directional responses following recombinant cytokine stimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) RTS-11 macrophage cells as revealed by transcriptome profiling. **BMC genomics**, v. 8, p. 1-18, 2007.
25. PIWOCKA, Oliwia et al. Navigating challenges: optimising methods for primary cell culture isolation. **Cancer Cell International**, v. 24, n. 1, p. 28, 2024.

5 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho contribui para a validação das citocinas recombinantes de hamster sírio dourado, demonstrando sua funcionalidade biológica por meio de ensaios de viabilidade celular e análise de expressão gênica em células CHO-K1. Embora os resultados apontem para uma modulação efetiva da resposta celular, a validação completa dessas citocinas depende de testes adicionais em modelos mais representativos do sistema imunológico do hamster sírio. A caracterização dessas proteínas abre oportunidades para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e terapias direcionadas, avançando o uso do hamster sírio como modelo experimental em estudos imunológicos.

6 REFERÊNCIAS

ABDULL RAZIS, Ahmad Faizal et al. Expression of recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli* and characterization of its biological activity. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 144, p. 249-261, 2008.

ANDERSEN, Monica L.; WINTER, Lucile MF. Animal models in biological and biomedical research-experimental and ethical concerns. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. suppl 1, p. e20170238, 2017.

AUNG, Theint et al. Recent and future perspectives on engineering interferons and other cytokines as therapeutics. **Trends in biochemical sciences**, v. 48, n. 3, p. 259-273, 2023.

BARRÉ-SINOUSSE, F. & MONTAGUTELLI, X. (2015). Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. **Future Science OA**. 1(4).

BATISTA JÚNIOR, Miguel Luiz et al. Efeito anti-inflamatório do treinamento físico na insuficiência cardíaca: papel do TNF- α e da IL-10:[errata]. **Arq. bras. cardiol**, p. 279-279, 2010.

BELMA, Pehlivanović et al. Animal models in modern biomedical research. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 6, p. 35-38, 2019.

BEUTLER, Bruce; CERAMI, Anthony. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. **Annual review of immunology**, v. 7, n. 1, p. 625-655, 1989.

BIENVENU, J. A. D. et al. Cytokine assays in human sera and tissues. **Toxicology**, v. 129, n. 1, p. 55-61, 1998.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA**. Brasília: MCTI, 2013.

BUNDE, Tiffany Thurow et al. Characterization of cellular immune response in hamsters immunized with recombinant vaccines against leptospirosis based on LipL32: LemA: LigAni chimeric protein. **Microbial Pathogenesis**, v. 184, p. 106378, 2023.

BUNDE, Tiffany T. et al. A systematic review on the selection of reference genes for gene expression studies in rodents: are the classics the best choice?. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 1017, 2024.

CAPELLI, Chiara et al. Potency assays and biomarkers for cell-based advanced therapy medicinal products. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1186224, 2023.

CHEN, WanJun. TGF- β Regulation of T Cells. **Annual review of immunology**, v. 41, n. 1, p. 483-512, 2023.

COE, J. E.; SCHELL, R. F.; ROSS, M. J. Immune response in the hamster: definition of a novel IgG not expressed in all hamster strains. **Immunology**, v. 86, n. 1, p. 141, 1995.

COLBY, L.A., QUENEE, L.E. & ZITZOW, L.A. (2017). Considerations for Infectious Disease Research Studies Using Animals. **Comparative Medicine**. 67(3). p. 222. A

COUTO, Luzinei da Silva et al. Intranasal Vaccination with Leishmanial Antigens Protects Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Against Leishmania (Viannia) braziliensis Infection. 2015.

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 742-780, 1997.

DAS, Prabir Kumar; SAHOO, Ansuman; VEERANKI, Venkata Dasu. Current status, and the developments of hosts and expression systems for the production of recombinant human cytokines. **Biotechnology Advances**, v. 59, p. 107969, 2022.

DAO, Bang Ngoc et al. Relationship between serum TNF- α , IL-6, and IL-10 levels and disease severity, and changes in the cytokines after treatment in patients with bacterial community-acquired pneumonia. **Pneumon**, v. 36, n. 4, 2023.

DIEM, P.; DUCLUZEAU, P. H.; SCHEEN, André. The discovery of insulin. **Diabetes Epidemiology and Management**, v. 5, p. 100049, 2022.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 5. ed., Strasbourg, Council of Europe, v. 1, p. 161-168, 2004.

ESPITIA, C. M. et al. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. **BMC immunology**, v. 11, p. 31, 2010.

FEENEY, W.P. (2012). The Chinese or Striped-Back Hamster. **In The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents**. p. 907–922.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Experimental models in research. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. SUPPL. 2, p. 28–34, 2005.

GAZZINELLI, Ricardo T. et al. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 148, n. 6, p. 1792-1796, 1992.

HAYAT, Seyed MG et al. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 6, p. 718-725, 2018.

HOCHMAN, B. et al. Experimental model in hamster (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. suppl 1, p. 69–78, 2004.

HUO, Jiandong et al. A potent SARS-CoV-2 neutralising nanobody shows therapeutic efficacy in the Syrian golden hamster model of COVID-19. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 5469, 2021.

İNCİR, İbrahim; KAPLAN, Özlem. *Escherichia coli* as a versatile cell factory: Advances and challenges in recombinant protein production. **Protein expression and purification**, p. 106463, 2024.

ISHIKAWA, Mayumi et al. A novel specific bioassay for serum human growth hormone. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 11, p. 4274-4279, 2000.

International Organization for Standardization ISO 10993-5: 2009. **Biological Evaluation of Medical Devices** – Part 5: Tests for in Vitro cytotoxicity.

IVASHKIV, Lionel B.; DONLIN, Laura T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36-49, 2014.

JAFFER, Uo; WADE, R. G.; GOURLAY, T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. **HSR proceedings in intensive care & cardiovascular anesthesia**, v. 2, n. 3, p. 161, 2010.

JAYAPAL, Karthik P. et al. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. **Chemical engineering progress**, v. 103, n. 10, p. 40, 2007.

LABNETWORK. Fiocruz tem sucesso com hamsters em vacina experimental contra a leishmaniose. Disponível em: <https://www.labnetwork.com.br/noticias/fiocruz-tem-sucesso-com-hamsters-em-vacina-experimental-contra-a-leishmaniose>. Acesso em: 12 abr. 2025.

LARSEN, Marianne W. Expression of a lipase in prokaryote and eukaryote host systems allowing engineering. 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - **Royal Institute of Technology, School of Biotechnology**, Stockholm, 2009.

LEE, Jai-Wei et al. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 219-229, 2006.

LI, Ming O. et al. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, n. 1, p. 99-146, 2006.

LIGUORI, Gabriel R. et al. Ethical issues in the use of animal models for tissue engineering: reflections on legal aspects, moral theory, three rs strategies, and harm–benefit analysis. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 23, n. 12, p. 850-862, 2017.

LIU, Chao et al. Cytokines: from clinical significance to quantification. **Advanced Science**, v. 8, n. 15, p. 2004433, 2021.

LIU, Yushan et al. Codon optimization, expression, purification, and functional characterization of recombinant human IL-25 in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 10349-10358, 2013.

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

MIEDEL, E. L.; HANKENSON, F. C. Chapter 5 - Biology and Diseases of Hamsters. **Laboratory Animal Medicine: Third Edition**. [s.l: s.n.]. p. 209–245, 2015.

MUKHERJEE, P., ROY, S., GHOSH, D. & NANDI, S.K. (2022). Role of animal models in biomedical research: a review. **Laboratory Animal Research**. 38(1).

NUMATA, Takafumi et al. IL-10 promotes Th17 cell differentiation by enhancing STAT1-dependent IL-6 production via IgE-stimulated mast cells. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 26706, 2024.

OGG, Monica et al. Ribavirin protects Syrian hamsters against lethal hantavirus pulmonary syndrome—after intranasal exposure to Andes virus. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2704-2720, 2013.

OPARIN, Aleksandr Ivanovich. The origin of life on the earth. 1957.

OVERBERGH, Lutgart et al. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. **Journal of biomolecular techniques: JBT**, v. 14, n. 1, p. 33, 2003.

PARANGA, Tudorita Gabriela et al. Cytokine Storm in COVID-19: Exploring IL-6 Signaling and Cytokine-Microbiome Interactions as Emerging Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 21, p. 11411, 2024.

PEDRA, Ana CK et al. Production of recombinant cytokines and polyclonal antibodies for analysis of cellular immune response in golden Syrian hamster. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 1012, 2024.

PIWOCKA, Oliwia et al. Navigating challenges: optimising methods for primary cell culture isolation. **Cancer Cell International**, v. 24, n. 1, p. 28, 2024.

SANTOS, B.F. (2002). Criação e Manejo de Hamters. In **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. p. 123–126

SARKAR, S. & HEISE, M.T. (2019). Mouse Models as Resources for Studying Infectious Diseases. **Clinical Therapeutics**. 41(10). p. 1912–1922.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Mouse IL-10 Recombinant Protein. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/proteins/product/Mouse-IL-10-Recombinant-Protein/210-10-10UG>. Acesso em: 13 abr. 2025.

VALENTINE, H.; DAUGHERITY, E.K.; SINGH, B.; MAURER, K.J. The Experimental Use of Syrian Hamsters. 1st ed., **Elsevier Inc.**, 2012.

VARMA, Vivek P. et al. LigA formulated in AS04 or Montanide ISA720VG induced superior immune response compared to alum, which correlated to protective efficacy in a hamster model of leptospirosis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 985802, 2022.

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

VERNEL-PAUILLAC, F.R. & GOARANT, C. (2010). Differential cytokine gene expression according to outcome in a hamster model of leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**.

WAHL-JENSEN, V. et al. Use of the syrian hamster as a new model of ebola virus disease and other viral hemorrhagic fevers. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3754–3784, 2012

WARNER, B.M.; SAFRONETZ, D.; KOBINGER, G.P. Syrian Hamsters as a Small Animal Model for Emerging Infectious Diseases: Advances in Immunologic Methods. **Adv Exp Med Biol**. v. 972, p. 87-101, 2017.

WOLD, W.S.M. & TOTH, K. (2012). Syrian Hamster as an Animal Model to Study Oncolytic Adenoviruses and to Evaluate the Efficacy of Antiviral Compounds 1st ed., **Elsevier Inc.**

WUNDER JR, Elsie A. et al. Real-time PCR reveals rapid dissemination of *Leptospira interrogans* after intraperitoneal and conjunctival inoculation of hamsters. **Infection and immunity**, v. 84, n. 7, p. 2105-2115, 2016

YAN, Chunguang et al. TNF- α induction of IL-6 in alveolar type II epithelial cells: contributions of JNK/c-Jun/AP-1 element, C/EBP δ /C/EBP binding site and IKK/NF- κ B p65/ κ B site. **Molecular Immunology**, v. 101, p. 585-596, 2018.

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