



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO PILOTO SOBRE IMUNOMODULAÇÃO NA
LEISHMANIOSE VISCERAL MURINA: BLOQUEIO DA
SINALIZAÇÃO DE IL-10 E USO DE IL-12**

FERNANDA REGIS GOMES

Salvador – Bahia

2018

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

ESTUDO PILOTO SOBRE IMUNOMODULAÇÃO NA
LEISHMANIOSE VISCERAL MURINA: BLOQUEIO DA
SINALIZAÇÃO DE IL-10 E USO DE IL-12

FERNANDA REGIS GOMES

Orientador: Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Co-Orientador: Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa
para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador-Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

G633e Gomes, Fernanda Regis
Estudo piloto sobre imunomodulação na leishmaniose visceral murina:
bloqueio da sinalização de IL-10 e uso de IL-12. / Fernanda Regis Gomes. -
2017.
80 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira, Laboratório de
Patologia e Intervenção.
Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Interleucina 10. 3. Plasmídeos. 4. Células.
I. Título.

CDU 616.993.161

" ESTUDO SOBRE IMUNOMODULAÇÃO NA LEISHMANIOSE VISCERAL MURINA: BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO DE IL-10 E USO DE IL-12."

FERNANDA REGIS GOMES

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisadora
FIOCRUZ



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
FIOCRUZ



Dra. Karine Araújo Damasceno
Pesquisadora
FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

*À Vida, por ter me proporcionado viver esta lição
de paciência, determinação e amor ao próximo.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pela concessão da bolsa e financiamento do projeto;

Ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira;

Ao Dr. Carlos Gustavo Regis pelo apoio nos momentos finais desta dissertação;

Ao Grupo GGSO: Marcus David, Matheus Moreno, Maria Carolina, Fernanda Lessa, Gisele, Aisla, Jéssica e Paula Dantas.

Ao Grupo WLCS, em especial à Isadora Matos e Dr. Washington Conrado pelo tempo que disponibilizaram para me auxiliar na análise dos achados histológicos;

À Livinha e Sérgio pelo apoio técnico;

À equipe do biotério pelo suporte, em especial a Valdomiro e Adriana;

Aos funcionários da biblioteca do IGM pelo apoio na estruturação deste trabalho.

GOMES, Fernanda Regis. Estudo piloto sobre imunomodulação na leishmaniose visceral murina: bloqueio da sinalização de IL-10 e uso de IL-12. 80 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária e é considerada negligenciada, segundo a organização mundial de saúde. O cão e o homem fazem parte da manutenção do ciclo da infecção. O crescente aumento de animais infectados acarreta em um problema de saúde pública, pois representa eminente risco de infecção para os humanos. Na LV, a resposta imune celular é suprimida favorecendo a replicação do parasito nos macrófagos e a exacerbação da doença. Estudos apontam que esta supressão pode estar relacionada à secreção da interleucina-10 (IL-10), pois esta tem o papel de regular o excesso de resposta inflamatória, inibindo a produção de IL-12. **OBJETIVO:** Nesta pesquisa, propõe-se produzir e purificar plasmídeos codificando receptor de IL-10 e IL-12 murinos, bem como produzir e purificar o receptor de IL-10 murino na forma solúvel no sistema baculovírus-células de inseto, visando avaliar os efeitos de substâncias imunomoduladoras em camundongos infectados com *Leishmania infantum/chagasi*, com o intuito de desenvolver um método imunoterápico para cães com LV. **METODOLOGIA:** Na primeira parte deste trabalho, camundongos BALB/c foram infectados com *L. infantum/chagasi*, por via venosa e em seguida foram injetados quatro vezes, com intervalo de 7 dias entre as doses, com salina (G1), pcDNA3.1 (plasmídeo controle) (G2), pcDNA3.1mIL-12 (G3), pcDNA3.1mIL-10R1 (G4) e pcDNA3.1mIL-12+ pcDNA3.1mIL-10R1 (G5), por via intramuscular, seguida de eletroporação. Os efeitos da administração dos plasmídeos foram avaliados através da análise histológica do fígado e baço e pela determinação da carga parasitária do baço por PCR em tempo real. Na segunda parte deste trabalho foi produzida e purificada através do sistema baculovírus-célula de inseto, a proteína rmusIL-10R1. Além disso, foi realizado o ensaio de atividade biológica em células MC/9 para avaliar se a proteína produzida e purificada possui atividade funcional. **RESULTADOS:** A administração de plasmídeos codificadores do receptor de IL-10R1 em associação com IL-12 seguida de eletroporação apresentou efeitos sistêmicos nos grupos G3 e G5, como presença de granulomas maduros no parênquima hepático e nos espaços portais, intenso infiltrado inflamatório no parênquima hepático, aumento do centro germinativo no tecido esplênico e redução da carga parasitária. O rendimento obtido da proteína produzida e purificada foi de 678 µg por litro de cultivo. **CONCLUSÃO:** Os efeitos observados na primeira parte do trabalho podem ser atribuídos somente à ação da IL-12 e não do receptor de IL-10. Na segunda etapa do trabalho evidenciou-se que a proteína rmusIL-10R1 não foi capaz de bloquear a sinalização mediada por IL-10 murina.

Palavras-chaves: Leishmaniose Visceral experimental; Interleucina 10; Receptor solúvel de IL-10 Murina; Plasmídeos; Baculovírus; Células MC/9.

GOMES, Fernanda Regis. Pilot study on immunomodulation in murine visceral leishmaniasis: blockade of IL-10 signaling and use of IL-12. 80 f. il. Dissertation (Masters in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Oswaldo Cruz Foundation, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Visceral leishmaniasis (VL) is an infectious-parasitic disease and is considered neglected, according to the World Health Organization. The dog and the man are part of maintaining the cycle of infection. The increasing numbers of infected animals have a public health problem, as it represents an imminent risk of infection for humans. In LV, the cellular immune response is suppressed favoring the replication of the parasite in the macrophages and the exacerbation of the disease. Studies indicate that this suppression may be related to the secretion of interleukin-10 (IL-10), since it has the role of regulating the excess inflammatory response, inhibiting the production of IL-12. **PURPOSE:** In this research, it is proposed to produce and purify murine IL-10 and IL-12 receptor encoding plasmids, as well as to produce and purify the murine IL-10 receptor in the soluble form of the baculovirus-insect cells system, in order to evaluate the effects of immunomodulatory substances in mice infected with *Leishmania infantum* / *chagasi*, with the aim of developing an immunotherapeutic method for dogs with VL. **METHODOLOGY:** In the first part of this work, BALB / c mice were infected with venom intravenous *L. infantum* and then injected four times, with 7 days between doses, with saline (G1), pcDNA3.1 (G2), pcDNA3.1mIL-12 (G3), pcDNA3.1mIL-10R1 (G4) and pcDNA3.1mIL-12 + pcDNA3.1mIL-10R1 (G5), followed by electroporation. The effects of plasmid administration were assessed by histological analysis of the liver and spleen and determination of spleen parasite load by real-time PCR. In the second part of this work the rmusIL-10R1 protein was produced and purified through the baculovirus-insect cell system. In addition, the biological activity assay was performed on MC / 9 cells to assess whether the produced and purified protein has functional activity. **RESULTS:** Administration of IL-10R1 receptor-encoding plasmids in association with IL-12 followed by electroporation showed systemic effects in the G3 and G5 groups, such as presence of mature granulomas in the hepatic parenchyma and portal spaces, intense inflammatory infiltrate in the hepatic parenchyma, increase of the germinal center in the splenic tissue and reduction of the parasitic load. The yield of the produced and purified protein was 678 µg per liter of culture. **CONCLUSION:** The effects observed in the first part of the work can be attributed only to the action of IL-12 and not the IL-10 receptor. In the second stage of the work it was shown that the rmusIL-10R1 protein was not able to block murine IL-10 mediated signaling.

Keywords: Experimental Visceral Leishmaniasis; Interleukin 10; Soluble murine IL-10 Receptor; Plasmids; Baculovirus; MC / 9 Cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i>	17
Figura 2	Produção de IL-10 por diferentes tipos celulares	20
Figura 3	Via de sinalização por IL-10	21
Quadro 1	Tratamento de camundongos com pcDNA3.1mIL-10R1 em associação ou não com pcDNA3.1mIL-12	28
Figura 4	Avaliação dos plasmídeos produzidos por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio	41
Figura 5	Escore quanto à intensidade da inflamação do parênquima no tecido hepático dos camundongos	42
Figura 6	Seções do fígado dos camundongos BALB/c do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1mIL-12 (A e B) e pcDNA3.1 controle (C)	43
Figura 7	Escore quanto à frequência de granuloma no espaço porta do tecido hepático dos camundongos	44
Figura 8	Seções do fígado dos camundongos BALB/c do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1 controle (A e B) e pcDNA3.1mIL-12 (C e D)	45
Figura 9	Escore quanto à frequência de granuloma no parênquima do tecido hepático dos camundongos	46
Figura 10	Seções do fígado dos camundongos BALB/c do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1mIL-12(A e B) e pcDNA3.1 controle (C e D)	47
Figura 11	Escore quanto ao tamanho do centro germinativo do tecido esplênico dos camundongos	48
Figura 12	Seções do baço dos camundongos BALB/c do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1mIL-10R1 (A) e pcDNA3.1mIL-12 (B)	48
Figura 13	Análise da carga parasitária	49
Figura 14	Avaliação do produto da PCR de bacmídeo por eletroforese em de gel de agarose	51

Figura 15	Ensaio de otimização da expressão de r _{mus} IL-10R1 em células High-Five infectadas pelo baculovírus recombinante AcBAC Δ cc-r _{mus} IL-10R1	53
Figura 16	Avaliação da purificação do receptor solúvel de IL-10 murino recombinante (r _{mus} IL-10R1) por eletroforese em gel de poliacrilamida	54
Figura 17	Avaliação da atividade biológica do receptor solúvel de IL-10 murino recombinante em mastócitos da linhagem MC/9	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcMNPV	Vírus da polihedrosis nuclear múltipla da <i>Autografa californica</i> (do inglês, <i>Autografa californica</i> Multiple Nuclear polyhedrosis)
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMEM	Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês, Desoxyribonucleic acid)
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GP64	Glicoproteína 64
High-Five	<i>Trichoplusia ni</i> BTI-TN-5B1-4
His	Histidina
IFN- γ	Interferom gama
TGF- β	Fator de crescimento e transformador beta
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-13	Interleucina 13
IL-10R1 ou IL-10R α	Subunidade sóluvel do receptor de IL-10
IL-10R2 ou IL-10R β	Subunidade insóluel do receptor de IL-10
rcaIL-4	Interleucina 4 canina recombinante
rmuIL-10	Interleucina 10 murina recombinante
rmusIL-10R1	Receptor solúvel de IL-10 murina recombinante
IPTG	Isopropil-tio-galactosídeo
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodálon
LB	Agar Luria Bertani
LV	Leishmaniose Visceral
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio

MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês, <i>multiplicity of infection</i>)
NBT	Itroazultetrazólio-dimetil formamidado (do inglês, <i>Nitro Blue Tetrazolium</i>)
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato monossódico
NaK ₂ PO ₄	Fosfato dipotásico e sódico
NaCl	Cloreto de sódio
NK	Células Natural Killer
<i>pFastBac1-GP64musIL10R1</i>	Plasmídeo carreador, adequado para expressão no sistema baculovírus-células de inseto, contendo o cDNA que codifica para IL-10R1
<i>pUC57-kan-GP64musIL10R1</i>	Plasmídeo de clonagem, doador do gene de interesse
PBS	Tampão fosfato tamponado com salina (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
Sf-9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TBS – T	TBS + Tween 20
TBS-T-L	TBS + Tween 20 + leite desnatado a 5%
TCID ₅₀	Diluição de vírus capaz de infectar 50% das culturas de células
Th	Célula T auxiliadora
<i>T. ni</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
TOI	Tempo de infecção
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNM-FH	Graces Modified Medium
X-gal	Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL	16
2.2	LEISHMANIOSE VISCERAL NO MODELO MURINO	18
2.3	INTERLEUCINA 10 (IL-10).	19
2.3.1	Características gerais	19
2.3.2	Aplicações terapêuticas	22
2.4	INTERLEUCINA 12 (IL-12).....	22
2.4.1	Características gerais	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4.	METODOLOGIA	25
4.1	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICADORES DE IL-10R1 E IL-12 MURINOS PARA O TRATAMENTO DOS ANIMAIS.....	25
4.1.1	Quantificação e avaliação dos plasmídeos codificadores de IL-10R1 e IL-12 murinos	26
4.2	EXPERIMENTO PILOTO.....	26
4.2.1	Considerações éticas	26
4.2.2	Animais	27
4.2.2.1	<i>Infeção visceral e administração dos plasmídeos por eletroporação</i>	27
4.2.2.2	<i>Parâmetros avaliados</i>	29
4.2.3.2.1	<u>Avaliação Histopatológica do fígado e baço</u>	29
4.2.3.2.2	<u>Carga parasitária do baço</u>	29
4.2.4	Proposta de análise	30
4.3	PRODUÇÃO DO RECEPTOR SOLÚVEL DE IL-10 MURINO RECOMBINANTE UTILIZANDO O SISTEMA-BACULOVÍRUS CÉLULA DE INSETO.....	31
4.3.1	Desenho experimental	31

4.3.2	Obtenção do bacmídeo recombinante codificando o receptor solúvel de IL-10 murino	32
4.3.2.1	<i>Transformação química de Escherichia coli DH10AcBacΔcc com o plasmídeo pFastBac1- musIL-10R1</i>	32
4.3.2.2	<i>Extração do bacmídeo recombinante</i>	33
4.3.3	Manutenção de células de inseto	34
4.3.4	Obtenção de estoque viral	34
4.3.4.1	<i>Transfecção de células de inseto Spodoptera frugiperda (Sf-9) com bacmídeo recombinante</i>	34
4.3.4.2	<i>Isolamento do primeiro estoque viral (P1) e titulação viral</i>	35
4.3.4.3	<i>Amplificação viral</i>	36
4.3.5	Ensaio de otimização da produção de proteína recombinante	36
4.3.5.1	<i>Dot blot</i>	37
4.3.6	Produção das proteínas recombinantes	38
4.3.7	Purificação do receptor solúvel de IL-10 murino recombinante por cromatografia de afinidade	38
4.4	ENSAIO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE RMUSIL-10R1 UTILIZANDO MASTÓCITOS DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM MC/9	39
5	RESULTADOS	41
5.1	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS CODIFICADORES DE IL-10R1 E IL-12 MURINOS PARA O TRATAMENTO DOS ANIMAIS	41
5.2	ANÁLISE DO TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM OS PLASMÍDEOS CODIFICADORES DE IL-10R1 E IL-12 MURINOS	42
5.2.1	Avaliação Histopatológica do fígado e baço	42
5.2.2	Carga parasitária do baço	49
5.3	PRODUÇÃO DO RECEPTOR SOLÚVEL DE IL-10 MURINO (RMUSIL-10R1)	49
5.3.1	Transposição do segmento de DNA entre Tn7L e Tn7R da construção plasmideal pFastBac1-GP64musIL-10R1 para o cromossoma artificial do baculovirus	50
5.3.2	Obtenção de estoque viral para a produção de proteína recombinante .	51
5.3.3	Produção da rmusIL-10R1	52

5.3.3.1	<i>Avaliação da produção e purificação da rmusIL-10R1</i>	53
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE <i>RMUSIL-10R1</i> PRODUZIDA EM CÉLULAS HIGH-FIVE INFECTADAS COM BACULOVÍRUS RECOMBINANTE	54
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	63
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	75

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (STANLEY e ENGWERDA, 2007; ALVARENGA et al., 2010 WHO, 2016). Dentre elas, a forma visceral é a mais grave que, se não tratada adequadamente, pode levar o hospedeiro à morte.

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) era uma doença de caráter exclusivamente rural, mas a intensificação do fluxo migratório em direção aos centros urbanos a partir da década de 80 provocou modificações no ambiente natural causando degradação de áreas preservadas, tornando a doença emergente nos centros urbanos (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; RANGEL e VILELA, 2008; VILELA et al., 2014). O principal vetor associado à transmissão do parasito é o inseto da espécie *Lutzomyia longipalpis* (GALATI et al., 1997). Estudos relacionados à capacidade vetorial de *L. longipalpis* confirmaram a transmissão da espécie *L. infantum chagasi* ao hospedeiro vertebrado como o homem e o cão (LAINSON e RANGEL, 2005; SAVANI et al., 2009). O agente etiológico da LV faz parte do complexo *Leishmania donovani* o qual é composto pelas espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum chagasi*, sendo a última espécie encontrada no Brasil (GONTIJO e MELO, 2004).

O cão é o principal reservatório da *Leishmania infantum chagasi* no Brasil (BRASIL, 2014). As drogas existentes que são utilizadas para o tratamento em humanos, como os antimoniais pentavalentes e anfotericina B (STANLEY e ENGWERDA, 2007), não são eficazes para o tratamento canino, pois além de não manterem uma resposta imune protetora (Th1) por um longo período, podem selecionar cepas resistentes do parasito, o que seria um grave problema (MORENO, et al., 1999; RHALEM, et al., 1999). A dificuldade do sistema imunológico do cão em desenvolver células de memória e em polarizar e sustentar a função efetora dos linfócitos T (Th1) pode estar envolvida na ineficácia do tratamento do cão (CARVALHO, et al., 1992; PINELLI, et al., 1994; PINELLI, 1995; KAYE, et al., 2004).

A resposta imune protetora contra a infecção por *L. infantum chagasi* é mediada por células do tipo Th1. A principal citocina envolvida na diferenciação de linfócitos T *naïve* para linfócitos Th1 é a interleucina 12 (IL-12) (ABBAS, et al., 2008). A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória, secretada principalmente por macrófagos e células

dendríticas, que apresenta a capacidade de estimular as células T CD4⁺ e células *natural killer* (NK) a produzirem interferon gama (IFN - γ), sendo esta última importante para o controle da infecção por promover a estimulação da atividade microbicida dos macrófagos infectados (MACATONIA, et al., 1995). Além disso, a IL-12 também pode estimular linfócitos T CD4⁺ a produzirem interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória secretada quando há uma superprodução de citocinas inflamatórias, com função regulatória durante a exacerbação da doença (JEANNIN, et al., 1996; MEHROTRA, et al. 1998; NYLEN e SACKS, 2007).

Por mais de 50 anos, o tratamento disponível para leishmaniose visceral se restringia à administração parenteral de antimônio pentavalente ou pentamidina, drogas com alta toxicidade, administração de doses elevadas e regime de tratamento longo (KAYE et al., 2004). Estudos sobre tratamentos alternativos aos tradicionais, que promovam o controle da infecção em menor tempo de terapia e com baixa toxicidade têm sido amplamente encontrados na literatura (MURRAY, HARIPRASHAD e FICHTL, 1993; MURRAY et al., 2003; DAVIES et al., 2003; MURRAY, 2004; MURRAY, 2012).

A partir da década de 90, algumas formulações foram desenvolvidas, dentre elas a fórmula lipídica de anfotericina B, cuja ação é direcionada aos macrófagos infectados (MURRAY, 2004; MURRAY, 2012). Sua efetividade é observada a doses baixas e apresenta curta duração do tratamento, mas devido à administração ser dada pela via intravenosa, é necessário que a aplicação seja dada por profissionais da área de saúde, tornando o tratamento oneroso. Porém a eficácia do tratamento depende de vários fatores como idade do paciente, carga parasitária e da cepa do parasito (WHO, 2010; MURRAY, 2004; BRASIL, 2014).

Atualmente, o Ministério da Saúde orienta como uma das medidas de controle a eutanásia de cães infectados, pois estes não respondem eficientemente ao tratamento com as drogas convencionais disponíveis. Estudos com cães naturalmente infectados com *L. infantum* e tratados com miltefosina, apontaram que esta droga não é recomendada para áreas endêmicas, uma vez que o tratamento não resulta em cura parasitológica, logo os cães permanecem infectivos para os insetos vetores (ANDRADE et al, 2011; MANNA et al, 2009). Além disso, o crescente aumento de animais

infectados acarreta em um problema de saúde pública, pois representa eminente risco de infecção para os humanos (BRASIL, 2009).

Desta forma, o desenvolvimento de uma vacina ou um tratamento eficaz para o cão é de suma importância para o controle da LV, o que poderá contribuir para a redução da incidência da doença tanto nos cães quanto no homem.

Devido ao menor custo e ao conhecimento sobre a fisiologia e imunologia, o modelo experimental murino tem sido amplamente utilizado para melhor compreender a resposta imune na LV. Dessa forma, propomo-nos a avaliar o potencial terapêutico do bloqueio da IL-10 em combinação ou não com IL-12 no tratamento da LV murina. Para isso utilizamos duas ferramentas de avaliação: plasmídeo contendo o inserto correspondente ao receptor de IL-10 murino associado ou não ao plasmídeo contendo o inserto correspondente à IL-12 murina e a proteína correspondente à porção extracitoplasmática do receptor de IL-10 murino na forma solúvel produzida através do sistema baculovírus-célula de inseto. Este trabalho poderá contribuir no desenvolvimento de uma estratégia terapêutica direcionada a LV em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE VISCERAL

A Leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade causada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae (SILVA et al., 2014) e são transmitidos ao homem ou a outro vertebrado através da picada do inseto vetor pertencentes à ordem Diptera e família Psychodidae, de gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente como flebotomíneo, tatuquira e mosquito-palha (FORATTINI, 1954; LEWIS, 1971; SILVA, 2007).

A LV ocorre nos quatro continentes no mundo com exceção da Oceania e é endêmica em países do leste da África, Índia, Sudão e Brasil, sendo agravada por fatores que suprimem o sistema imunológico como a má nutrição, comum em países com alto índice de pobreza (DESJEUX, 2001; MURRAY, 2004; WHO, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2016), o Brasil apresentou mais de mil casos de LV no ano de 2013 e cerca de 310 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença.

O agente etiológico que desencadeia a infecção no Brasil faz parte do complexo *Leishmania donovani* (LAINSON et al., 1987; MURRAY et al., 2005), o qual inclui as espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi*, sendo esta última encontrada no Brasil. A *L. chagasi* é identificada também como *Leishmania infantum* (MAURICIO et al., 1999; LUKES et al., 2007). Este protozoário apresenta-se em duas formas distintas quando presente no hospedeiro e no inseto vetor. Ao realizarem o repasto sanguíneo na pele do vertebrado, as fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas, inoculam as formas promastigotas metacíclicas (formas infectivas) na pele do hospedeiro onde serão fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocítico (macrófagos e células dendríticas), além dos neutrófilos. (BACELLAR e CARVALHO, 2005). No interior das células do sistema mononuclear fagocítico, o parasito desenvolve a conformação amastigota ou aflagelada, que devido à mudança de pH do meio retraem o flagelo para a bolsa flagelar (SILVA et al., 2014), podendo assim, suportar o ambiente ácido e se proliferarem no interior destas células por divisão binária, lisando as mesmas e infectando outras. Desta forma, os parasitos migram para outras células, ocorrendo

tropismo para outros órgãos linfóides como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, promovendo o estabelecimento da infecção (HANDMAN, 2001) (Figura 1).

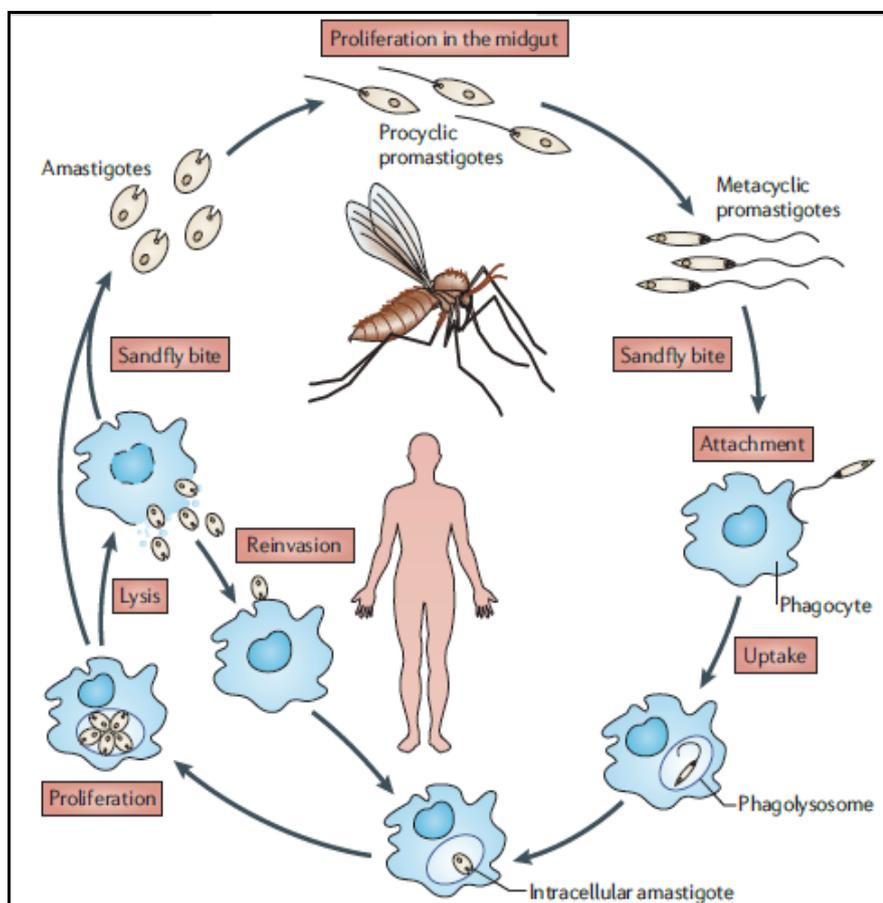


Figura 1: Ciclo de vida da *Leishmania sp.* Fonte: KAYE, SCOTT, 2011.

Uma série de medidas de controle para a LV tem sido elaboradas pelo Ministério da saúde, incluindo o tratamento dos casos em humanos com as drogas existentes no mercado como os antimoniais pentavalente e anfotericina B lipossomal, a eutanásia dos cães diagnosticados com a enfermidade, o controle dos insetos vetores com periódica borrifação de inseticidas à base de piretróides e ações em educação em saúde e ambiental (BRASIL, 2009).

No cão infectado com o parasito, a doença se manifesta em 3 formas clínicas distintas: assintomática, oligossintomática e polissintomática. A forma polissintomática é a manifestação característica da LV canina, apresentando lesões cutâneas, onicogribose, diminuição da massa corpórea, insuficiência renal, apatia, diarreia,

linfadenomegalia e anemia (CIARAMELLA et al., 1997; MORENO et al., 1999; KOUTINAS et al., 1999).

O tratamento canino com as mesmas drogas utilizadas para tratar os casos humanos é contra-indicado, pois, apesar do animal apresentar cura clínica, não apresenta cura parasitológica. Além disso, a administração das drogas convencionais em cães pode selecionar cepas resistentes do protozoário (GRAMICCIA et al., 1992; MORENO et al., 1999). Desta forma, novas abordagens de tratamento e desenvolvimento de vacinas efetivas para os animais são de extrema importância para a saúde pública. Para isso, alguns modelos animais são utilizados para tais pesquisas sendo o camundongo o mais usado.

2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL NO MODELO MURINO

Estudos visando à modulação da resposta imune contra protozoários do gênero *Leishmania* são amplamente encontrados na literatura, utilizando para isto modelos animais. Dentre os modelos experimentais existentes, o mais utilizado para o estudo da infecção visceral é o camundongo, pois a oferta de distintas linhagens de animais com modificações genéticas e a ampla disposição de reagentes imunológicos permitem compreender os aspectos das interações celulares e imunológicas da LV (PORROZZI, CAVALCANTI e CUPOLILLO, 2014).

O curso da infecção visceral pode apresentar desfechos diferentes de acordo com as distintas linhagens de camundongos que podem ser classificadas geneticamente como susceptíveis (BALB/c e C57BL/10) ou resistentes (C57BL/6, CBA e C3H) (BLACKWELL e PLANT, 1986; KAYE, et al., 2004). Esta diferença genética é atribuída à capacidade do camundongo em controlar a replicação do protozoário no interior dos macrófagos e esta característica é controlada pelo gene *ScllA1* (antigo *Nramps1*) (VIDAL et al., 1995). Os animais que possuem alteração funcional deste gene, que codifica uma proteína transportadora de íons presente na membrana do fagolisossoma dos macrófagos infectados, perdem a capacidade de controlar o crescimento parasitário, tornando-se susceptível (BLACKWELL et al., 2001).

A infecção experimental em linhagens susceptíveis foi demonstrada em diversos estudos e observou-se que o parasitismo possui características diferentes no fígado e no

baço (CERVIA, ROSEN e MURRAY, 1993; KAYE et al., 2004). A análise do fígado após a infecção por formas amastigotas do protozoário do complexo *Leishmania donovani*, demonstrou um pico da carga parasitária nas quatro primeiras semanas de infecção, ao passo que sua diminuição foi observada na oitava semana (CERVIA, ROSEN e MURRAY, 1993). Análises histológicas do fígado permitem a visualização de granulomas. Este aglomerado de células produzem quimiocinas que atraem outros tipos celulares como monócitos, neutrófilos, linfócitos T CD4+ e CD8+ e citocinas inflamatórias como IFN γ , IL-2, IL-12 e TNF- α . Para equilibrar o excesso de resposta inflamatória, células presentes no granuloma também produzem citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β . No baço, o pico parasitário apresenta-se mais lento, e a infecção é sustentada por mais tempo, conseqüentemente são observadas alterações morfológicas no órgão que comprometem sua funcionalidade (NIETO, 2011; YURDAKUL et al., 2011). Em uma investigação da resposta imune em camundongos resistentes e susceptíveis, demonstrou que os animais resistentes apresentam a capacidade de diferenciar linfócitos T para o tipo Th1 (CD8+ e CD4+) que secretam altas quantidades de IFN γ antes e durante a infecção por *L. donovani*, proporcionando o controle da infecção precocemente (LEHMANN et al, 2004).

2.3 INTERLEUCINA 10 (IL-10)

2.3.1 Características gerais

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória relacionada às alterações das funções de células T indiretamente, por inibir as funções das células apresentadoras de antígenos (APCs), favorecendo a susceptibilidade do indivíduo à infecção por patógenos intracelulares (BACELLAR, et al., 2000). Por outro lado, IL-10 tem a função de co-estimular a proliferação de linfócitos B e mastócitos (THOMPSON-SNIPES et al., 1991; KOTENKO et al., 1997). Diversas células estão relacionadas à secreção desta citocina como: linfócitos Th2, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B, mastócitos, eosinófilos e diferentes tipos de células T regulatórias (Treg) (O'GARRA, et al., 2008; JANKOVIC, et al., 2010) (Figura 2).

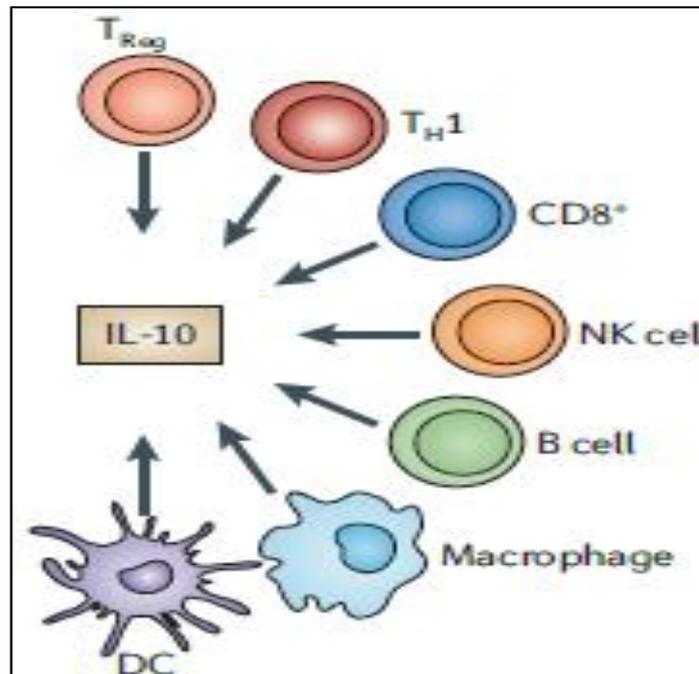


Figura 2: Produção de IL-10 por diferentes tipos celulares. Fonte: KAYE, SCOTT, 2011.

A sinalização por IL-10 é iniciada quando a própria citocina se liga ao seu receptor presente na superfície da membrana das células. O receptor da IL-10 é composto por duas subunidades conhecidas como IL-10R1 ou IL-10R α e IL-10R2 ou IL-10R β . A subunidade solúvel IL-10R1 ou IL-10R α está localizada na porção extra citoplasmática e possui alta afinidade com a molécula de IL-10. Já a subunidade insolúvel IL-10R2 ou IL-10R β está localizada na porção intracelular, a qual inicia a sinalização celular pela fosforilação das proteínas quinases (JAK1 e TYK2), no momento em que a IL-10 se liga ao receptor IL-10R1 ou IL-10R α (ASADULLAH, STERRY e VOLK, 2003) (Figura 3).

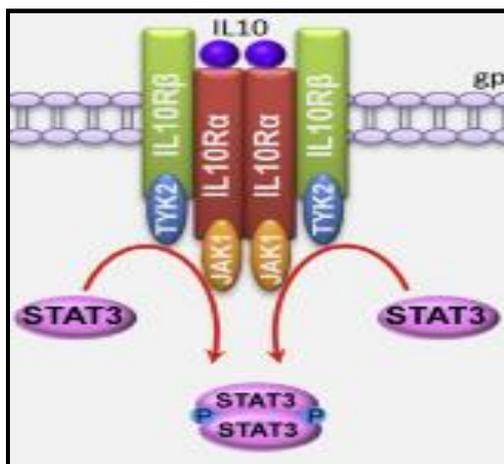


Figura 3: Via de sinalização por IL-10. Fonte: SHOUVAL et al., 2014.

Na LV, falhas no mecanismo indutor de linfócitos T do tipo Th1 estão relacionadas à dificuldade do organismo em controlar a infecção, sendo a IL-4 e IL-13 as principais citocinas de perfil Th2 relacionadas a este fato (MURRAY, 2004). Além disso, IL-10 em conjunto com IL-4 inibe a secreção de IL-2 e IFN- γ , consequentemente impede que o hospedeiro monte uma resposta imune celular eficiente (MIRALLES, et al., 1994; MURRAY, et al., 1997).

A susceptibilidade à infecção por *L. infantum* pode estar relacionada à sinalização por IL-10, pois esta citocina tem a função de regular o sistema imune frente à produção de citocinas inflamatórias, a exemplo da IL-12. Sua ação sobre macrófagos inibe produção de radicais livres como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e outros, além da produção de NO, os quais tem papel leishmanicida. Sendo assim, a intensa produção de IL-10 provoca a inibição da resposta do macrófago, inativando a ação das citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), e desta forma, deixará de produzir IL-12 a qual é responsável pela ativação de linfócitos T CD4+ e NK (MURRAY et al., 2002; MURRAY et al., 2003; ABBAS, et al., 2008; PIERSON e LISTON, 2010; NANDAN et al., 2011).

2.3.2 Aplicações terapêuticas

Diversas pesquisas têm sido elaboradas com o intuito de desenvolver métodos imunoterapêuticos, tendo como alvo o bloqueio da IL-10 e/ou estimulação da produção de IFN- γ endógeno por administração de IL-12 exógena (MURRAY et al., 2005).

Marchi et al. (2011) demonstraram em um modelo de melanoma em camundongos da linhagem C57BL/6 que a combinação de IL-12 e uma ferramenta para bloqueio de IL-10 induz a polarização de linfócitos T para Th1 de forma mais eficaz do que isoladamente, demonstrando uma redução das células tumorais frente à imunoterapia.

Murray et al. (2002) demonstraram que o bloqueio da sinalização por IL-10, utilizando anticorpos anti-IL-10R, reduziu a carga parasitária no curso da infecção por *L.donovani* em camundongos BALB/c. Porém a utilização de anticorpos monoclonais produzidos em camundongos como ferramenta para neutralizar IL-10 não é eficaz devido a sua rápida eliminação pelo sistema imune humano (CHAMES, et al., 2009; CARDONE, et al., 2011). Além disso, não existem estudos mostrando a abordagem terapêutica de IL-12 em combinação com uma ferramenta bloqueadora da sinalização por IL-10 como potencial tratamento para a LV.

2.4 INTERLEUCINA 12 (IL-12)

2.4.1 Características Gerais

A Interleucina 12 (IL-12), inicialmente denominada de fator estimulatório de células NK (CAR, et al., 1999), é uma citocina inflamatória relacionada à ativação da resposta imune celular Th1. Esta característica é devido à eficácia da IL-12 estimular células T CD4⁺ e células *natural killer* (NK) a produzirem interferon gama (IFN- γ) e diferenciar células T *naïve* em Th1 ativadas (BLISS et al., 1996; MURRAY e HARIPRASHAD, 1995; MURRAY, 1997; GORAK, ENGWERDA e KAYE, 1998).

Sua produção está sob a responsabilidade de diversas células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e neutrófilos (TRINCHIERI, 2003).

Na LV, a sinalização por IL-12 ativa a secreção de IFN- γ a qual induz a estimulação dos macrófagos e induzindo estes a produzirem radicais livres com capacidade leishmanicida (BLISS et al., 1996; MURRAY, 1997).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial biotecnológico de IL-10R1 e IL-12 como moléculas imunomoduladoras no controle da infecção por *Leishmania infantum/chagasi* no modelo experimental murino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar os efeitos do bloqueio da sinalização por IL-10 em combinação ou não com IL-12 na evolução da leishmaniose visceral no modelo murino;

3.2.2 Avaliar o sistema baculovírus-célula de inseto como método para a produção do receptor solúvel de IL-10 de camundongo (rmusIL-10R1);

3.2.3 Avaliar a atividade biológica do receptor solúvel de IL-10 de camundongo produzida no sistema baculovírus-células de inseto.

4 METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICADORES DE IL-10R1 E IL-12 MURINOS

Foram utilizadas *E. coli* das linhagens TOP 10 (Invitrogen) e DH5- α , previamente transformadas em nosso laboratório com as construções plasmídeais *pcDNA3.1* sem inserto (Anexo), *pcDNA3.1-mu-IL-12* e *pcDNA3.1-muIL-10R1*, mantidas a -70 °C.

O isolamento dos plasmídeos foi realizado pelo método de lise alcalina e a purificação foi feita por cromatografia de troca iônica utilizando os reagentes do “Plasmid Giga kit” (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As bactérias transformadas com cada uma das construções plasmídeais ou plasmídeo sem inserto foram semeadas em placas de petri contendo meio LB ágar com ampicilina a 100 $\mu\text{g/mL}$. Após 16 ou 18 horas foram isoladas uma colônia de cada placa e inoculada em 5 mL de meio LB caldo com o respectivo antibiótico em tubos de vidro. Os inóculos foram incubados por 8 horas, a 37 °C, sob agitação de 250 rpm em incubadora orbital. Após este período, os 5 mL de cultura de cada inóculo foram utilizados para inocular 2,5 L de meio LB caldo com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina em frascos Erlenmeyer e incubados por 16 horas, a 37 °C e 250 rpm. O sedimento bacteriano foi isolado por centrifugação a 6.000 x g, por 15 minutos a 4 °C e armazenados em freezer a -20 °C até o momento do uso.

Os sedimentos bacterianos contendo as respectivas construções plasmídeais foram ressuspensos em solução tampão (P1) contendo Tris-Cl a 50 mM, pH 8.0, EDTA a 10 mM e RNase A a 100 $\mu\text{g/mL}$ e em seguida, para realizar a lise e desnaturação do DNA, foi adicionada a solução tampão (P2) composta por NaOH a 200 mM e SDS a 1% (w/v), misturou-se gentilmente por 4-6 vezes e incubou-se por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Foi acrescentado à suspensão o tampão (P3) composto por acetato de potássio (CH_3COOK a 3.0 M, pH 5.5) para neutralizar a solução e renaturar o DNA, e incubou-se por 30 minutos no gelo. A solução foi submetida à centrifugação 6.000 x g, por 60 minutos, a 4 °C, para coletar o

sobrenadante contendo o DNA plasmideal. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e submetido novamente à centrifugação nas mesmas condições anteriores para remover precipitados que possam obstruir a coluna. O sobrenadante foi filtrado e aplicado em uma coluna cromatográfica de troca iônica inicialmente equilibrada com tampão de equilíbrio composto por NaCl a 750 mM, 3-(N-morfolino) ácido profano sulfônico (MOPS) 50 mM, pH 7.0, isopropanol a 15% (v/v) e Triton X-100 a 0.15% (v/v). Após a passagem do sobrenadante, a coluna foi lavada com tampão de lavagem composto por NaCl a 1M, MOPS a 50 mM, pH 7.0 e isopropanol a 15% (v/v) e, em seguida, o material foi eluído com tampão composto por NaCl a 1.25 M, Tris-Cl a 50 mM, pH 7.5 e isopropanol a 15% (v/v). O material de cada construção plasmideal foi precipitado em isopropanol, homogeneizado e centrifugado a 5.000 x g, por 60 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado com etanol a 70% e centrifugado novamente a 5.000 x g, por 60 minutos, a 4 °C. O etanol foi removido e os tubos contendo o material ficaram abertos, no fluxo, para evaporação dos vestígios de álcool. O DNA plasmideal foi ressuspensão em 5 mL de PBS 1 X estéril e armazenados a – 20 °C até o momento do uso.

4.1.1 Quantificação e avaliação dos plasmídeos codificadores de IL-10R1 e IL-12 murinos

Para determinar a concentração de DNA plasmideal e o grau de pureza foi realizada a leitura da densidade óptica a 260 e 280 nm (Nanodrop, ND-1000, Thermo Scientific, EUA) e a avaliação da integridade através da análise em gel de agarose a 1% com brometo de etídio (SAMBROOK et al., 2001).

4.2 EXPERIMENTO PILOTO

4.2.1 Considerações éticas

O experimento com os animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (protocolo CEUA 004/2016) do Instituto Gonçalo Moniz.

4.2.2 Animais

Foram utilizados 15 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com sete semanas de idade, gerados pelo biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM-FIOCRUZ-Salvador-Bahia). Foram divididos em cinco grupos de três animais cada (nomeados: G1, G2, G3, G4 e G5). Os camundongos foram alojados em caixas com dimensões de 30 x 19,5 x 12 cm, sendo três animais por caixa, durante o período do experimento, no biotério do IGM, sob condições adequadas de temperatura (21 ± 1 °C) e de umidade (50 – 60%). Os animais foram mantidos com alimentação e água *ad libitum*.

4.2.2.1 Infecção visceral e administração dos plasmídeos por eletroporação

Os animais foram injetados, via veia da cauda, com 1×10^7 promastigotas de *L.infantum/chagasi* (cepa MHOM/BR2000/MER2), no dia 0 do experimento. Em seguida, os camundongos foram tratados quatro vezes com os plasmídeos solubilizados em salina na concentração de 1 mg/mL ou apenas salina (Quadro 1), via intramuscular (quadríceps esquerdo), com intervalo de sete dias entre as doses, nos dias 0, 7, 14 e 21 do experimento, seguido de eletroporação. Antes da eletroporação, cada animal foi submetido à anestesia geral com Tiopental a 60 mg/Kg, administrado por via intraperitoneal. Um animal do grupo G3 (pcDNA3.1+ pcDNA3.1mIL-12) veio ao óbito após o retorno anestésico.

A técnica de eletroporação foi empregada no local da injeção com plasmídeo/salina para permitir a permeabilidade da membrana e assim, facilitar a entrada dos plasmídeos nas células e consistiu em cinco pulsos elétricos de 100 Volts/cm, com duração de 20 milisegundos por pulso e duração de 1 segundo entre cada dois pulsos consecutivos (LUCAS & HELLER, 2001). O aparelho eletroporador foi desenvolvido pelo Dr. Yuri Pepe do Departamento de Física da Universidade Federal da Bahia.

Ao final do experimento (28 dias) os animais foram eutanasiados e foram retirados o fígado e baço de cada animal para análise histológica e da carga parasitária.

Quadro 1 – Tratamento de camundongos com pcDNA3.1mIL-10R1 em associação ou não com pcDNA3.1mIL-12.

Grupos	1ª dose	2ª dose	3ª dose	4ª dose
G1	Salina	Salina	Salina	Salina
G2	pcDNA3.1	pcDNA3.1	pcDNA3.1	pcDNA3.1
G3	pcDNA3.1 + pcDNA3.1- mIL-12	pcDNA3.1 + pcDNA3.1-mIL- 12	pcDNA3.1 + pcDNA3.1-mIL- 12	pcDNA3.1 + pcDNA3.1-mIL-12
G4	pcDNA3.1 + pcDNA3.1- mIL-10R1	pcDNA3.1 + pcDNA3.1-mIL- 10R1	pcDNA3.1 + pcDNA3.1-mIL- 10R1	pcDNA3.1 + pcDNA3.1-mIL- 10R1
G5	pcDNA3.1mIL- 12 + pcDNA3.1- mIL-10R1	pcDNA3.1 mIL- 12 + pcDNA3.1-mIL- 10R1	pcDNA3.1 mIL- 12 + pcDNA3.1-mIL- 10R1	pcDNA3.1 mIL-12 + pcDNA3.1-mIL- 10R1

Doses e volumes de administração:

- Salina em 100 µL
- pcDNA3.1 (100 µg) em 100 µL de salina
- pcDNA3.1 (50 µg) + pcDNA3.1mIL-12 (50 µg) em 100 µL de salina
- pcDNA3.1 (50 µg) + pcDNA3.1mIL-10R1 (50 µg) em 100 µL de salina
- pcDNA3.1mIL-12 (50 µg) + pcDNA3.1mIL-10R1 (50 µg) em 100 µL de salina

4.2.2.2 Parâmetros avaliados

4.2.3.2.1 Avaliação Histopatológica

Após a eutanásia dos camundongos, foram removidos e pesados o fígado e baço de cada animal e fragmentos de cada órgão foram fixados em formalina 10% por 48 horas. Estes fragmentos, então, foram encaminhados ao serviço de Histopatologia do IGM, os quais foram processados, embebidos em parafina, realizados cortes ultrafinos e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A avaliação das lâminas foi realizada através de microscopia óptica pelo patologista da equipe que possui ampla experiência em avaliação histológica tanto em cães quanto em camundongos com LV. Para avaliar a inflamação no parênquima, a frequência de granulomas nos espaços portais e a frequência de granulomas no parênquima hepático foi atribuído escore de 0 a 3 (0= ausente; 1= Discreto; 2= Moderado; 3= Intenso) quanto à intensidade dessas estruturas, bem como determinar as populações de células predominante nestas estruturas. Foi utilizado o programa Image Pro-Plus v.7.0 para mensurar o tamanho do centro germinativo do baço de cada animal e assim determinar a média da área por grupo atribuindo um escore de 0 a 3 (0= Ausente; 1= Pequeno; 2= Médio; 3= Grande).

4.2.3.2.2 Carga parasitária

Para determinar a carga parasitária por miligrama de tecido foi realizada a técnica de PCR em tempo real a partir de um fragmento do baço de cada animal coletado após a eutanásia dos animais. O material foi submetido à extração do DNA com DNAeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante, e a concentração foi avaliada pelo espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA). Para digestão das amostras foi utilizada proteinase K durante a noite.

O ensaio de PCR em tempo real, para detecção de DNA de *Leishmania*, foi realizado de acordo com o método descrito por Francino e colaboradores (FRANCINO et al., 2006). Em uma placa de 96 poços foram adicionadas triplicatas de 25 µL de reações contendo 150 ng de DNA da amostra, *primers* LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') e uma sonda FAM-MGB (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-MGB) da sequência conservada do mini círculo de DNA de *Leishmania* ou iniciadores específicos

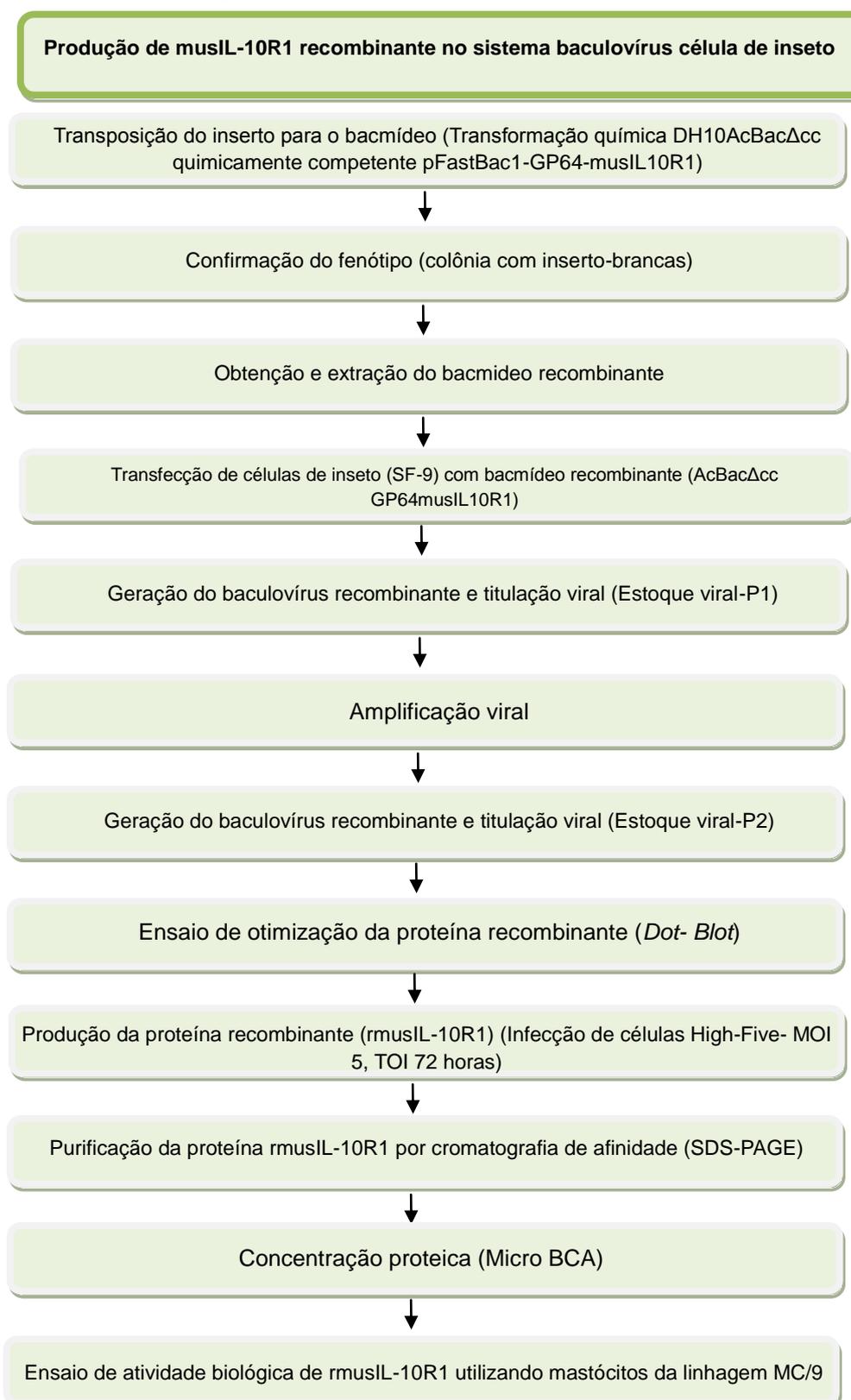
e sonda para detecção do gene constitutivo 18S rDNA de mamíferos (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e TaqMan mix master (Applied Biosystems). Foi realizada uma curva de calibração, e para isto, foram utilizadas quantidades de $0,1-10^5$ de DNA de promastigotas de *Leishmania*. Foi utilizado um sistema de PCR em tempo real fast 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) para a realização e leitura das reações. A carga parasitária foi expressa por número de *Leishmania* por grama de tecido do baço.

4.2.4 Proposta de análise

Os dados foram analisados utilizando os programas GraphPad Prism 5.02. Os resultados são expressos em valores absolutos e relativos, em gráficos e através de análise descritiva no texto da dissertação. Não foi possível aplicar teste estatístico pois se tratou de um estudo piloto com número reduzido de animais.

4.3 PRODUÇÃO DO RECEPTOR SOLÚVEL DE IL-10 MURINA RECOMBINANTE UTILIZANDO O SISTEMA BACULOVÍRUS-CÉLULA DE INSETO

4.3.1 Desenho experimental



4.3.2 Obtenção do bacmídeo recombinante codificando o receptor solúvel de IL-10 murino

Para a obtenção do bacmídeo recombinante foi utilizado o sistema de expressão de proteínas Bac-to-Bac[®] “*Baculovirus Expression System*” (Invitrogen). Este sistema é composto por uma cepa bacteriana *E.coli* DH10AcBac Δ cc e um plasmídeo doador que possui o gene de interesse o qual expressa o receptor solúvel da interleucina 10 de camundongo. A bactéria *E.coli* DH10AcBac Δ cc possui, além do seu nucleóide, o DNA viral modificado e um plasmídeo auxiliar codificador da enzima transposase, a qual tem a função de auxiliar no processo de transposição do gene de interesse, localizado no plasmídeo doador, para o DNA do baculovírus.

4.3.2.1 Transformação química de *Escherichia coli* DH10AcBac Δ cc com o plasmídeo *pFastBac1-musIL-10R1*

Foi sintetizada, quimicamente, a construção do gene codificador do *musIL-10R1* (Genscript Piscataway, EUA) e clonada em um plasmídeo *puC57-kan*, gerando a construção *puC57-kan-musIL-10R1*. O gene localizado na construção *puC57-kan-musIL-10R1* foi subclonado para o plasmídeo *pFastBac1*(Anexo), gerando a construção *pFastBac1-musIL-10R1*.

Foi utilizado 1uL da construção *pFastBac1-musIL-10R1* para transformar 100 uL de *E.coli* DH10AcBac Δ cc quimicamente competente, por choque térmico. A mistura do plasmídeo com a bactéria foi incubada no gelo por 30 minutos e após esse período foi dado o choque térmico incubando a mistura a 42° C por 45 segundos e transferindo, imediatamente, para o gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, foi adicionado 900 uL do meio SOC (triptona a 2%, extrato de levedura a 0,5%, NaCl a 10 mM, KCl a 2,5 mM, MgCl₂ a 10 mM, MgSO₄ a 10 mM e glicose a 20 mM) à mistura e incubados a 37° C por 4 horas em roda giratória para obtenção das bactérias transformadas. Após a finalização da incubação, foi semeado um volume de 100 uL das bactérias transformadas em meio sólido Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos kanamicina (50 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL), o isopropil-tiogalactosídeo (IPTG) a 40 µg/mL e X-gal a 100 µg/mL e incubadas a 37° C por 48 horas

para o crescimento das colônias. Após 48 horas, foram observadas colônias brancas e azuis. As colônias brancas representam os clones onde houve a transposição do gene *musIL-10R1* para o bacmídeo e as colônias azuis representam os clones que não houve a transposição. Para confirmação do fenótipo, uma colônia branca e uma colônia azul foram selecionadas e semeadas em um novo meio LB sólido suplementado com os mesmos antibióticos, anteriormente citados, IPTG e X-Gal e incubadas a 37° C por 48 horas.

4.3.2.2 *Extração do bacmídeo recombinante*

Para obter o bacmídeo recombinante, foi selecionada uma colônia branca proveniente da confirmação do fenótipo da transformação química e inoculada em 5 mL de meio LB líquido, em um tubo de ensaio de 15 mL, acrescido dos antibióticos kanamicina (50 µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL). Este inóculo foi incubado em uma roda giratória a 37° C por 16 a 18 horas a 250 rpm. Após este período, foi colocado 1,5 mL do cultivo em um tubo eppendorf e submetido à centrifugação a 14.000 xg em microcentrífuga (Mini Spin Plus *Eppendorf*®) por 45 segundos em temperatura ambiente para obtenção do sedimento bacteriano. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 300 uL de solução I (1,5mM Tris-HCl, 10mM EDTA, RNase 100µg/mL, pH 8,0) para sensibilizar a membrana bacteriana, com o auxílio do vórtex. Para promover a lise celular e desnaturação, foi acrescentado 300 uL de solução II (0.2N NaOH, 1% dodecil-sulfato de sódio – SDS) e inverteu-se o tubo, cuidadosamente, para misturar o conteúdo e incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 300 uL de solução III (acetato de potássio a 3 M, pH 5,5), inverteu-se o tubo para misturar o conteúdo e foi mantido no gelo por 10 minutos para precipitação do DNA bacteriano. Para separar o DNA genômico do bacmídeo recombinante, o conteúdo foi centrifugado a 14.000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorf contendo 800 uL de isopropanol, o qual foi invertido 5 vezes e mantido no gelo por 40 minutos. Esta reação permite a precipitação do bacmídeo recombinante. O tubo contendo o bacmídeo recombinante foi centrifugado a 14.000 xg por 15 minutos a temperatura ambiente, isto permitiu a visualização de um material

semi-translúcido no fundo do tubo, o que corresponde ao DNA viral recombinante. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao sedimento 500 uL de etanol 70% e o tubo foi invertido 3 vezes para a dissolução dos sais. Submeteu-se, novamente, a uma centrifugação de 14.000 g por 5 minutos, todo o sobrenadante foi descartado e o DNA foi dissolvido em 40 uL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) e armazenado a 4° C.

4.3.3 Cultivo de células de inseto

Foram cultivadas em suspensão linhagens de células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf-9; Invitrogen, Carlsbad, USA) e *Trichoplusia ni* BTI-TN-5B1-4 (High-Five; Invitrogen, Carlsbad, USA). As células da linhagem Sf-9 foram cultivadas a cada 2 ou 3 dias em meio TNM-FH (Sigma Chemical, St. Louis, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen), 0,1% de surfactante (Pluronic® F-68 solution, Sigma Chemical, St. Louis, USA) e 10 µg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma Chemical, St. Louis, USA). As células High-Five, foram cultivadas em meio Express-Five – SFM (Invitrogen), suplementado com 18 mM de L-glutamina (Invitrogen) e 10 µg/mL de sulfato de gentamicina, as passagens eram feitas entre 2 ou 3 dias.

4.3.4 Produção do baculovírus recombinante

4.3.4.1 *Transfecção de células de inseto Spodoptera frugiperda (SF-9) com bacmídeo recombinante*

A obtenção do baculovírus recombinante foi feita a partir da técnica de transfecção. As células de inseto da linhagem *Spodoptera frugiperda* (Sf-9, Invitrogen), foram transfectadas com o bacmídeo recombinante utilizando lipofectamina conforme recomendações do fabricante “Bac-to-Bac *Baculovirus Expression System*” (Invitrogen).

Para realização da transfecção foi utilizada uma placa de 6 poços (Costar Corning Incorporated, NY, USA) adicionando-se em cada poço 9×10^5 células em 2 mL de meio TNM-FH (Invitrogen) completo [TNM-FH suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen) e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina]. Além do poço da transfecção com o bacmídeo recombinante foram utilizados 3 poços, referentes ao controle negativo, à simulação de transfecção, porém sem o bacmídeo, e o bacmídeo sem o inserto correspondente à proteína. A placa, então, foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora para a adesão das células. Após as células aderirem ao fundo da placa, o meio foi removido e as células foram lavadas com 2 mL de meio TNM-FH sem suplemento. Paralelamente, foi preparada uma solução composta por 72 μL de Lipofectamina (Invitrogen) e 828 μL TNM-FH. Em seguida, foi adicionado 100 μL desta mistura em outro tubo de poliestireno contendo 5 μL dos bacmídios AcBAC Δ CC-musIL-10R1 e AcBAC Δ CC em 100 μL de meio TNM-FH sem soro bovino fetal e antibiótico e incubado por 20 minutos a 27 °C para a formação do complexo DNA/Lipossomo.

Após os 20 minutos de incubação foram adicionados 800 μL de meio TNM-FH sem soro e sem antibiótico em cada tubo de poliestireno contendo a mistura descrita acima. Para a transfecção, foram removidos os sobrenadantes dos poços e substituído por 1 mL do complexo DNA/Lipossomo, gota a gota, de forma lenta e uniforme. Em seguida a placa foi incubada por 5 horas a 27° C, na estufa B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e após esse período o sobrenadante foi removido e substituído por 2 mL de meio TNM-FH completo. Incubou-se, novamente, a placa por 6 dias, a 27° C, em câmara úmida.

4.3.4.2 *Isolamento do primeiro estoque viral (P1) e Titulação viral*

Finalizado os 6 dias após o início da transfecção, foi coletado de cada poço o meio de cultura contendo as partículas virais recombinantes e submetidos à centrifugação a 4° C, 500 x g, por 5 minutos e armazenados a 4°C, protegidos da luz para realizar titulação posteriormente.

A titulação do baculovírus recombinante AcBAC Δ CC-*rmusIL-10R1* (P1) foi feita pelo método de diluição limitante (O'REILLY et al., 1994) em placa de 96 poços (Costar Corning Incorporated, NY, USA) utilizando células Sf-9. Para isso, uma

quantidade de 10.000 células foi colocada em cada poço a um volume de 90 μL , em seguida a placa foi movimentada para frente e para trás a fim de distribuir as células nos poços. Após distribuir as células nos poços foi feita uma diluição seriada do vírus de 10^{-1} a 10^{-8} e aplicou-se um volume de 10 μL das diluições 10^{-1} e 10^{-3} a 10^{-8} do baculovírus (12 réplicas / diluição viral). Em uma fileira da placa havia células sem infecção para serem utilizadas como controle negativo do ensaio de titulação. A placa foi incubada na estufa B.O.D a 27°C , por 7 dias. A partir do terceiro dia de incubação, a placa passou a ser examinada diariamente para encontrar sinais de infecção por baculovírus como parada de crescimento celular, hipertrofia nuclear e lise celular. Ao fim dos 7 dias de incubação foi contado o número de poços que possuíam pelo menos uma célula infectada e determinou-se o título pela diluição capaz de infectar 50% das células (TCID_{50}), conforme equação de distribuição Poisson (O'REILLY et al., 1994).

4.3.4.3 Amplificação viral

A amplificação viral foi realizada infectando as células Sf-9 com o baculovírus recombinante *AcBAC Δ CC-rmusIL-10R1* (P1). As células foram cultivadas em suspensão em um volume de 100 mL a uma concentração de $2 \times 10^6/\text{mL}$ por 2 ou 3 dias. A viabilidade celular necessária para coletar o baculovírus recombinante deve ser menor que 80%. Após o período da infecção foi centrifugado a $130 \times g$, 4°C , por 5 minutos e o sobrenadante, contendo o baculovírus recombinante amplificado, foi armazenado a 4°C , protegido da luz e titulado conforme descrito anteriormente.

4.3.5 Ensaio de otimização da expressão de *musIL-10R1* recombinante

Para avaliar a melhor condição de infecção das células High-Five com o baculovírus recombinante para produção da proteína foi realizado o ensaio de otimização da expressão de *rmusIL-10R1* na forma secretada em células de *Trichoplusia ni* (BTI-TN-5B1-4, conhecidas como High-Five, Invitrogen). Para isso, $1 \times 10^6/\text{mL}$ células em meio Express Five[®] SFM (Invitrogen) foram aplicadas em placas de 6 poços

e incubadas por 30 minutos para adesão à placa. Em seguida, as células foram infectadas com o baculovírus recombinante AcBAC Δ CC-*musIL-10R1* (P2) utilizando multiplicidade de infecção (MOI) de 2, 5 ou 10. O baculovírus AcBAC Δ CC, que não possui inserto, foi utilizado como controle negativo com MOI 10. As placas foram incubadas, em câmara úmida, na estufa B.O.D, à 27° C durante 1 hora. Após 1 hora, removeu-se o meio de cultura e adicionou-se 2 mL de meio de cultura novo para remoção do soro bovino fetal presente nos estoques virais. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas para avaliação da expressão de *rmusIL-10R1* no sobrenadante de infecção coletados nos respectivos tempos de incubação, por *DOT-BLOT*.

4.3.5.1 *DOT- BLOT para avaliação da expressão do rmusIL-10R1*

Para avaliar a melhor expressão da proteína recombinante em células High-Five foi feito o ensaio de *Dot-Blot*. Para isso, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-cauda de histidina (R93025, Invitrogen) que se liga à proteína recombinante, que possui 6 moléculas de histidina. Em um *blotter* contendo uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories), foram aplicados 150 μ L de cada amostra correspondente ao sobrenadante do ensaio de otimização, as quais foram adsorvidas à membrana pela aplicação do vácuo acoplado ao *blotter*. Após a adsorção da proteína à membrana, esta foi retirada do aparelho e bloqueada em uma solução composta por Tris (TBS, NaCl a 137 mM, Tris 24,8 mM, pH 7,5), Tween 20 a 0,05 % (v/v, TBS-T) e leite desnatado a 5%, por 16 horas. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS 1X e Tween 20 a 0,05% (TBS-T) e em seguida incubada por 1 hora com anticorpo anti-his região c-terminal diluído 1:5000, em solução contendo TBS-T e leite desnatado a 5% (m/v) (TBS-T-L), a temperatura ambiente e sob agitação leve. Após a incubação com o primeiro anticorpo, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T e incubada com anticorpo conjugado *α -Mouse Polyvalent Immunoglobulins Alkaline Phosphatase Conjugate* (Sigma –A0162), diluído 1:500, em TBS-T-L, por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação leve. A membrana então foi lavada mais 4 vezes com tampão TBS 1X e Tween 20 a 0,05% (TBS-T) e mais uma vez com apenas TBS 1X. Para revelar as bandas da proteína, a membrana foi incubada por cerca de 10 minutos em um substrato para fosfatase alcalina (10 mL) [33 μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

(BCIP, Sigma-Aldrich) a 50 mg/mL e 330 μ L de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT, Sigma-Aldrich) a 10 mg/mL em 10 mL do tampão Tris a 100 mM, NaCl a 100 mM e MgCl₂ a 5 mM, pH 9,5] e para interromper a reação foi adicionado água destilada por 10 minutos.

4.3.6 Produção da proteína recombinante

Para produção da proteína correspondente ao receptor da interleucina 10 de camundongo (rmusIL-10R1), células High-Five em fase logarítmica de proliferação cultivadas em suspensão na concentração 2×10^6 /mL, em volume de 250 mL, foram infectadas com 5 partículas virais para cada célula (MOI 5). Após 72 horas, a suspensão celular foi centrifugada a 3.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 30.000 x g, por 1 hora a 4 °C, para remoção das partículas virais. Em seguida, o sobrenadante coletado foi submetido à diálise contra solução salina tamponada com fosfato PBS (NaCl a 137 mM, KCl a 2,68 mM, Na₂HPO₄ a 9,58 mM e NaK₂PO₄ a 1,47 mM, pH 7,4), pela aplicação de 2-3 banhos diários, por até 2 dias.

4.3.7 Purificação de musIL-10R1 recombinante por cromatografia de afinidade

A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna Sepharose quelada com níquel (coluna HisTrap HP, General Electrics Heathcare, Piscataway, EUA) acoplada a uma bomba peristáltica (Bio-Rad). Após os banhos na diálise, seguiu-se para a purificação da proteína segundo as recomendações do fabricante. Brevemente, foi adicionado imidazol ao sobrenadante de cultura pós-diálise para atingir a concentração final de 30 mM. A coluna cromatográfica foi equilibrada com tampão de ligação composto por PBS com imidazol a 30 mM. Os sobrenadantes dialisados foram aplicados à coluna. A coluna foi lavada com PBS com imidazol a 30 mM. Para a coleta das frações, a amostra foi eluída com tampão de eluição (PBS 1X com 500 mM de imidazol, pH 7,4).

As frações da proteína recombinante foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12 %, conforme método previamente descrito (LAEMMLI, 1970). Após observar no gel as frações contendo as

proteína recombinante, esta foi submetida à dessalinização para a troca de tampão para PBS através da coluna cromatográfica de gel filtração (His-Trap Desalting, General Electric Healthcare). As alíquotas dessalinizadas foram armazenadas a -70°C , até o momento do uso. Para determinação da concentração protéica, foi coletada uma alíquota da proteína e avaliada pelo método do ácido bicinconínico (Micro BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific).

4.4 ENSAIO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE RMUSIL-10R1 UTILIZANDO MASTÓCITOS DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM MC/9

A avaliação da atividade funcional da proteína recombinante musIL-10R1 foi realizada através de um ensaio de proliferação celular utilizando mastócitos da linhagem MC/9 (linhagem de mastócitos de camundongos, American Tissue and Cell Culture-ATCC, CRL-8306, Manassas, USA). Para a realização do ensaio as células MC/9 foram mantidas por passagens em meio DMEM completo [DMEM (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, USA), L-glutamina a 2 mM (Sigma-Aldrich), 2-mercaptoetanol a 0,05 μM (Sigma-Aldrich), bicarbonato de sódio a 1,5 g/L (Sigma-Aldrich)] e 10 % de T-stim (sobrenadante de esplenócitos de rato cultivados com concanavalina A a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, produzido em nosso laboratório: utilizou-se um rato Winstar para a remoção do fígado e obtenção de esplenócitos. O fígado foi macerado em meio DMEM, centrifugado e os esplenócitos foram ressuspensos em meio DMEM contendo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concanavalina A. Após isso, o cultivo foi incubado a 37°C , em atmosfera úmida com CO_2 a 5% por 72 horas para obtenção do sobrenadante contendo T-Stim). A obtenção das células para o ensaio de atividade biológica foi feita pela centrifugação das mesmas por 5 minutos, a $130 \times g$ e temperatura ambiente, lavadas duas vezes em meio DMEM e ressuspensas na concentração de 4×10^5 /mL em meio DMEM completo. Em seguida, foi adicionado 50 μL da suspensão celular aos poços de uma placa de microtitulação de 96 poços (Corning Incorporated Life Sciences). Foram feitas triplicatas de poços e adicionados 50 μL de: a) meio DMEM completo sem T-Stim, b) meio DMEM completo com T-Stim a 10 %, c) IL-10 recombinante murina a 0,5 ng/mL, d) muIL-10 (0,5 ng/mL) e rmusIL-10R1 (4

$\mu\text{g/mL}$). A placa foi incubada por 48 horas, a 37°C , em atmosfera úmida com CO_2 a 5%. Após as 48 horas foram adicionados volumes de $10\ \mu\text{L}$ de solução de alamar blue (Invitrogen) a 100% em cada poço e incubou-se por mais 6 horas, onde ao final deste período foi determinada a densidade óptica a 570 nm e 600 nm, em cada poço, no espectrofotômetro (SpectraMax 340PC Microplate Reader, 28 Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA). Para análise dos dados foi realizada uma comparação entre os valores de média da densidade óptica utilizando o software GraphPad Prism v.5.0.

5 RESULTADOS

5.1 PRODUÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICADORES DE IL-10R1 E IL-12 MURINOS PARA O TRATAMENTO DOS ANIMAIS

No gel foi possível observar a presença de duas bandas em cada raia correspondentes às construções plasmidiais. As bandas presentes na parte inferior correspondem aos plasmídeos na conformação superespiralados e as bandas na parte superior, a forma não espiralada (Figura 4). Os plasmídeos purificados *pcDNA3.1*, *pcDNA3.1-muIL-10R1* e *pcDNA3.1-muIL-12* apresentaram um rendimento de 2.108 ng/ μ L, 2.016 ng/ μ L e 1.251,4 ng/ μ L, respectivamente. A proporção da leitura óptica a 260/280 nm apresentou resultados aproximados a 1,8, o que indica baixa contaminação por proteínas.

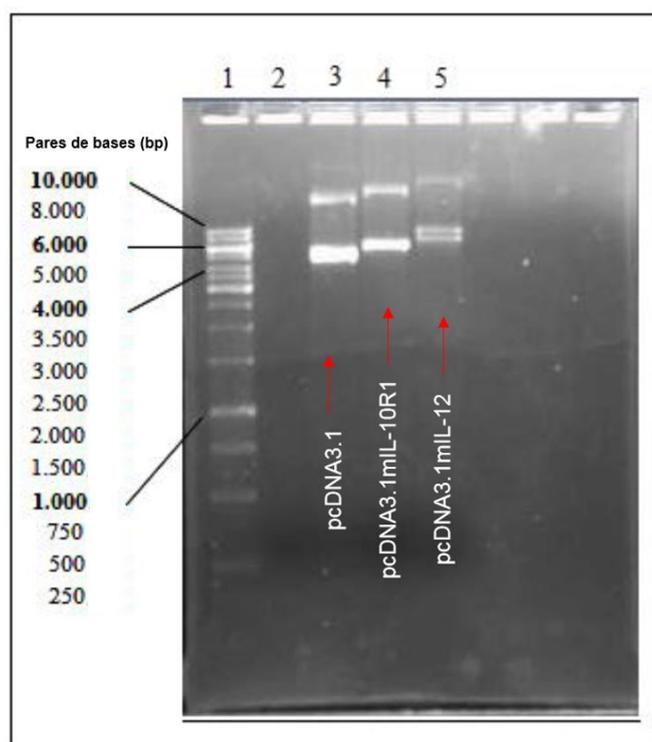


Figura 4: Avaliação dos plasmídeos produzidos por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio Raias: 1- Marcador de peso molecular; 2- Controle (água destilada); 3- *pcDNA3.1* (diluição 1:100); 4- *pcDNA3.1-mIL-10R1* (diluição 1:100); 5- *pcDNA3.1-mIL-12* (diluição 1:100).

5.2 ANÁLISE DO TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM OS PLASMÍDEOS CODIFICADORES DE IL-10R1 E IL-12 MURINOS

5.2.1 Avaliação Histopatológica do fígado e baço

Os animais tratados apenas com plasmídeos codificando IL-12 murina apresentaram infiltrado inflamatório intenso no parênquima, composto, principalmente, por células mononucleares inflamatórias, predominantemente, macrófagos e linfócitos. A mesma intensidade foi observada no grupo de animais tratados com plasmídeos codificantes da IL-12 murina juntamente com plasmídeos codificantes do receptor de IL-10 murino. Todos os animais do grupo tratado apenas com plasmídeos codificadores do receptor de IL-10 e grupos controle apresentaram intensidade de inflamação moderada no parênquima (Figura 5 e 6).

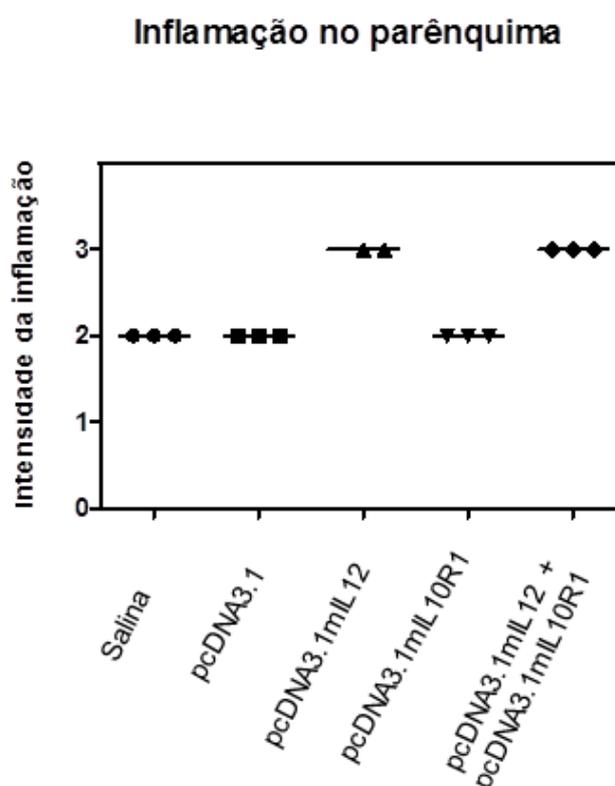


Figura 5: Escore quanto à intensidade da inflamação do parênquima no tecido hepático dos camundongos. Animais foram infectados com *L. infantum* por via venosa e o tratamento com plasmídeos foi feito por via intramuscular seguida de eletroporação. (Legenda: 0= Ausente; 1= Discreto; 2= Moderado; 3= Intenso).

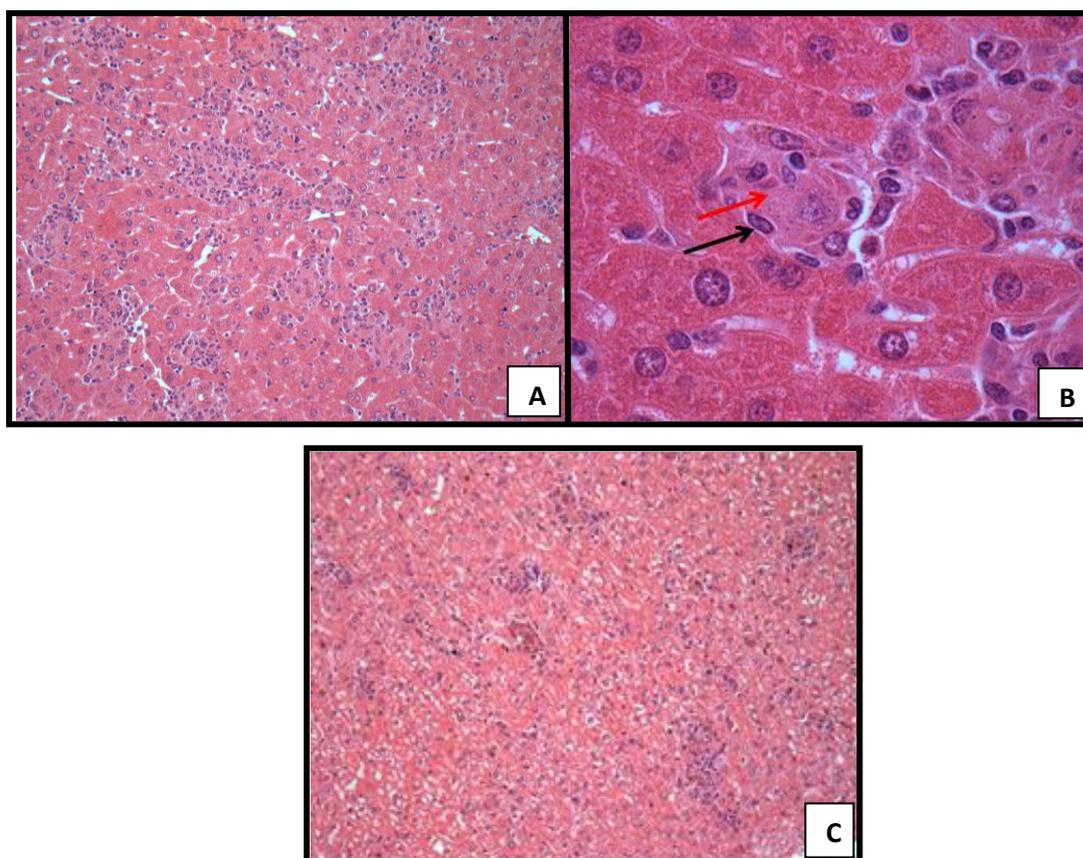


Figura 6: Seções do fígado dos camundongos BALB/c do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1mIL-12 (A e B) e pcDNA3.1 controle (C). As seções foram avaliadas quanto à intensidade de infiltrado inflamatório no parênquima e classificadas como: Ausente, Discreto, Moderado e Intenso. A imagem A e B representam, respectivamente, os animais dos grupos que receberam pcDNA3.1 mIL-12 e pcDNA3.1 mIL-12 + pcDNA3.1 mIL-10R1 e observa-se grau intenso de infiltrado inflamatório no parênquima. Em B observa-se os tipos celulares predominantes no infiltrado: macrófagos (seta vermelha) e linfócitos (seta preta). A imagem C representa o parênquima dos animais dos grupos controles e do grupo que recebeu somente pcDNA3.1 mIL-10R1, observa-se grau moderado de infiltrado inflamatório no parênquima, com predominância de macrófagos e linfócitos. Aumento 20X (A e C) e 100X (B), HE.

A frequência de granulomas no espaço porta foi intensa em todos os animais do grupo tratado apenas com plasmídeo codificando IL-12 murina e do grupo tratado com a combinação dos plasmídeos codificando IL-12 e receptor de IL-10 murino. No grupo de animais que foram administrados apenas com pcDNA3.1mIL-10R1 e grupos controles, apresentaram granulomas no espaço porta de forma discreta (Figura 7 e 8).

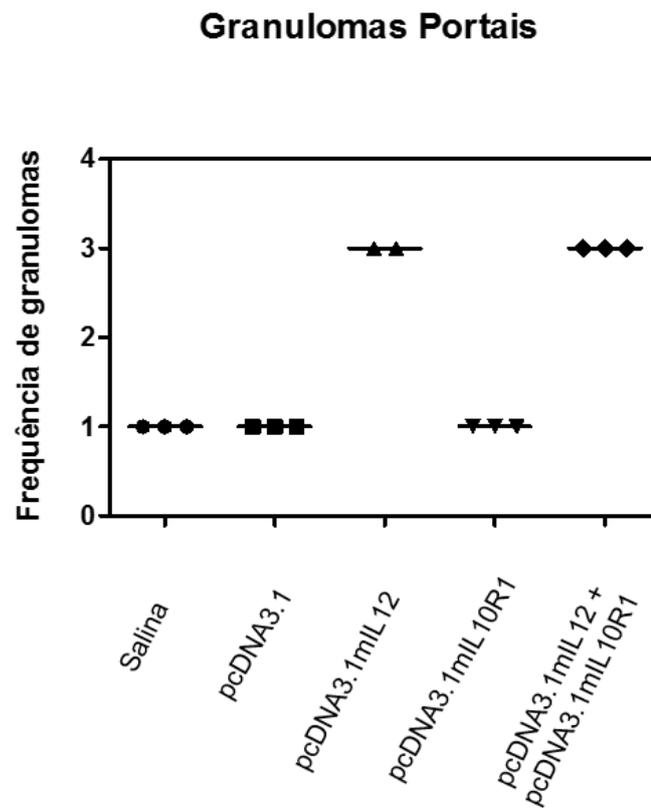


Figura 7: Escore quanto à frequência de granuloma no espaço porta do tecido hepático dos camundongos. Animais foram infectados com *L. infantum* por via venosa e o tratamento com plasmídeos foi feito por via intramuscular seguida de eletroporação. (Legenda: 0= Ausente; 1= Discreto; 2= Moderado; 3= Intenso).

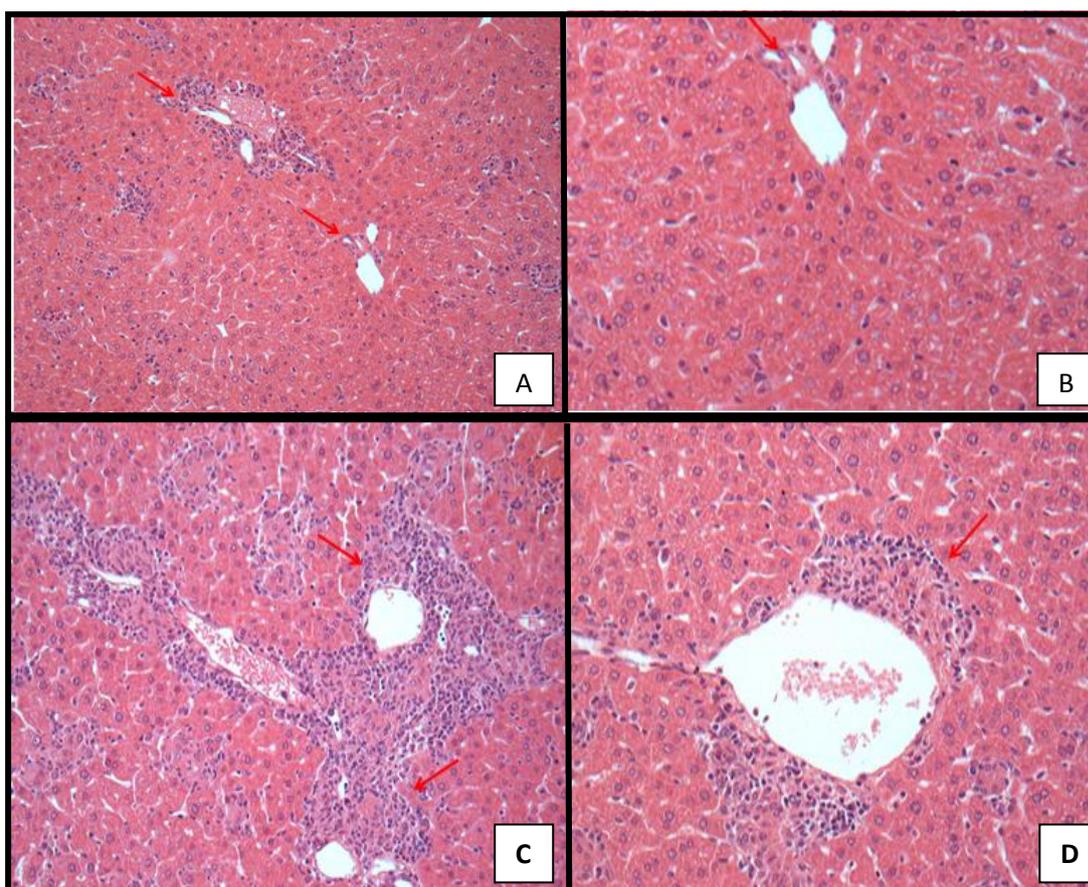


Figura 8: Seções do fígado dos camundongos BALB/c do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1 controle (A e B) e pcDNA3.1mIL-12 (C e D). As seções foram avaliadas quanto à frequência de granulomas no espaço porta e classificadas como: Ausente, Discreto, Moderado e Intenso. As imagens A e B representam, respectivamente, os animais dos grupos controles e do grupo que recebeu somente pcDNA3.1 mIL-10R1 e observa-se grau discreto de granulomas portais (setas). Em B observa-se os tipos celulares predominantes no infiltrado: macrófagos e linfócitos (setas). As imagens C e D representam, respectivamente, os animais dos grupos pcDNA3.1 mIL-12 e pcDNA3.1 mIL-12 + pcDNA3.1 mIL-10R1 e, observa-se grau intenso de granulomas portais, com predominância de macrófagos e linfócitos (D) Aumento 10X (A e C) e 20X (B e D), HE.

Quanto à frequência de granulomas no parênquima do tecido hepático foi observado uma intensidade maior nos grupos G3 (pcDNA3.1mIL-12) e G5 (pcDNA3.1mIL-12+ pcDNA3.1mIL-10R1). Os animais dos grupos controles e do grupo de animais que receberam somente plasmídeos codificando o receptor de IL-10 murino apresentaram intensidade moderada de granulomas no parênquima (Figura 9 e 10).

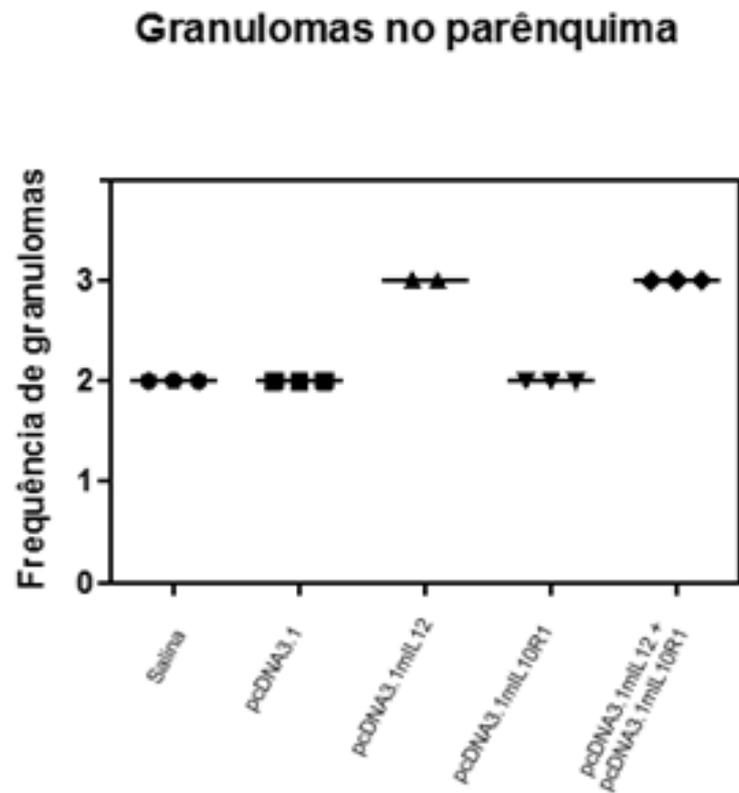


Figura 9: Escore quanto à frequência de granuloma no parênquima do tecido hepático dos camundongos. Animais foram infectados com *L. infantum* por via venosa e o tratamento com plasmídeos foi feito por via intramuscular seguida de eletroporação. (Legenda: 0= Ausente; 1= Discreto; 2= Moderado; 3= Intenso).

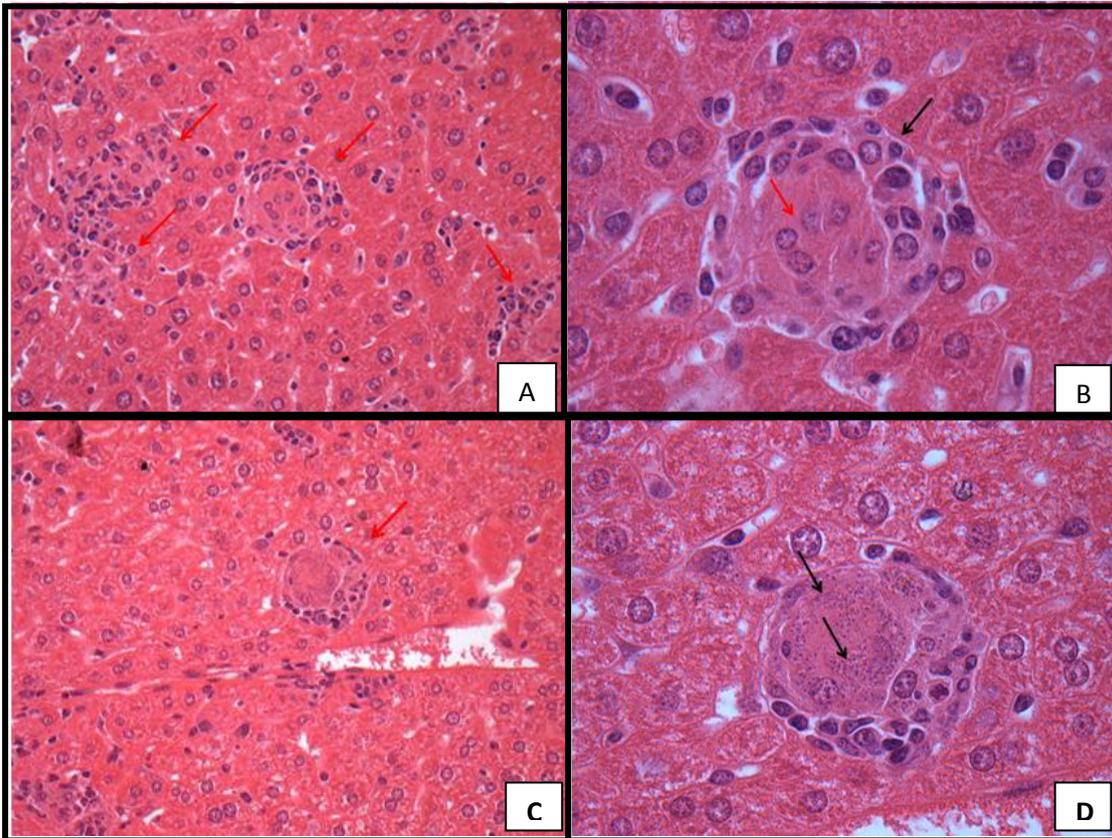


Figura 10: Seções do fígado dos camundongos BALB/c do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1mIL-12(A e B) e pcDNA3.1 controle (C e D). As seções foram avaliadas quanto à frequência de granulomas no parênquima e classificadas como: Ausente, Discreto, Moderado e Intenso. As imagens A e B representam, respectivamente, os animais dos grupos pcDNA3.1 mIL-12 e pcDNA3.1 mIL-12 + pcDNA3.1 mIL-10R1 e observa-se frequência intensa de granulomas no parênquima (setas). Em B observa-se granuloma composto por macrófagos (seta vermelha) e linfócitos (seta preta) e, aparentemente, livre de protozoário. As imagens C e D representam, respectivamente, os animais dos grupos controles e do grupo que recebeu somente pcDNA3.1 mIL-10R1 e, observa-se frequência moderada de granulomas, com predominância de macrófagos e linfócitos (D). No interior destas estruturas granulomatosas observa-se intenso parasitismo(D- setas). Aumento 40X (A e C) e 100X (B e D), HE.

Em relação à análise do tecido esplênico, os animais do grupo G3 (pcDNA3.1mIL-12) e G5 (pcDNA3.1mIL-12+ pcDNA3.1mIL-10R1) apresentaram centro germinativo maior (média da área por grupo: $1351393 \mu\text{m}^2$ e $28409,5 \mu\text{m}^2$, respectivamente) do que os grupos G1 (salina – $21823,5 \mu\text{m}^2$), G2 (pcDNA3.1 controle- $19936,5 \mu\text{m}^2$) e G4 (pcDNA3.1mIL-10R1- $37784,6 \mu\text{m}^2$). A análise das lâminas esplênicas dos demais grupos apresentou centro germinativo médio (Figura 11 e 12).

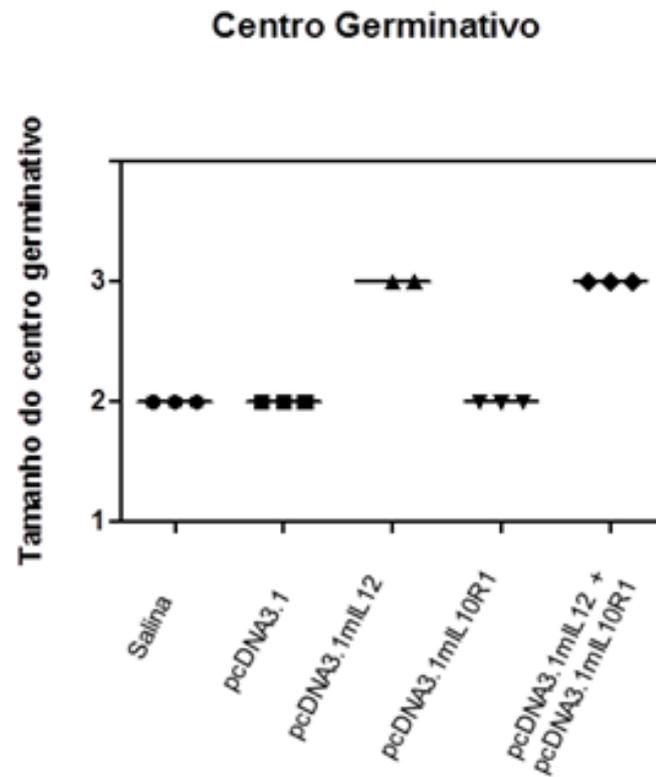


Figura 11: Escore quanto ao tamanho do centro germinativo no tecido esplênico dos camundongos. Animais foram infectados com *L. infantum* por via venosa e o tratamento com plasmídeos foi feito por via intramuscular seguida de eletroporação. A área do centro germinativo de cada animal foi determinada pelo programa Image Pro Plus v 7.0 e determinou-se a média de cada grupo. (Legenda: 0= Ausente; 1= Pequeno; 2= Médio; 3= Grande).

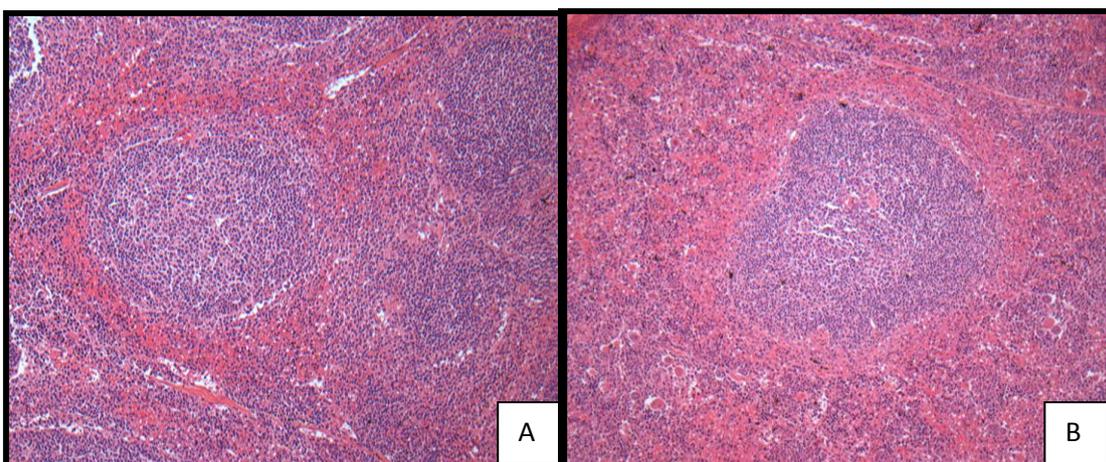


Figura 12: Seções do baço dos camundongos BALB/c do experimento piloto injetados com plasmídeo pcDNA3.1mIL-10R1 (A) e pcDNA3.1mIL-12 (B). As seções foram avaliadas quanto ao tamanho do centro germinativo: Médio (A) e Grande (B). Aumento 10X, HE.

5.2.2 Carga parasitária do baço

Os animais tratados com os plasmídeos codificando o receptor de IL-10 murino e IL-12 murina foram comparados com os grupos controle. Dentre os dados expressos, os animais do grupo que receberam somente salina, plasmídeo vazio (pcDNA3.1) e pcDNA3.1muIL-10R1, apresentaram uma progressão da infecção, expressando alta carga parasitária. O grupo administrado com pcDNA3.1mIL-10R1 em combinação com pcDNA3.1mIL-12 apresentou carga parasitária reduzida (Figura 13).

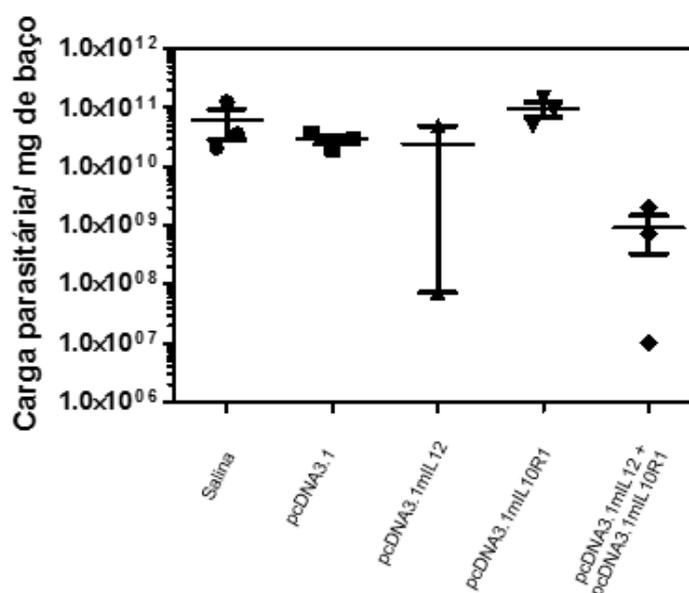


Figura 13. Análise da carga parasitária (Mediana).

5.3 PRODUÇÃO DO RECEPTOR SOLÚVEL DE IL-10 MURINO (*RMUSIL-10R1*)

Visando compreender o papel do bloqueio da IL-10 no curso da infecção visceral experimental murina, foi proposta neste estudo a produção do receptor solúvel de IL-10 de camundongo no sistema baculovírus-células de inseto e a avaliação dos seus efeitos na imunomodulação de camundongos com LV para posterior avaliação no sistema canino.

5.3.1 Transposição do segmento de DNA entre Tn7L e Tn7R da construção plasmideal pFastBac1-GP64musIL-10R1 para o cromossoma artificial do baculovirus

A transferência do segmento correspondente ao *GP64-musIL-10R1* que se encontra entre *Tn7L* e *Tn7R* para o bacmídeo (AcBac Δ CC) foi realizada pela transformação de uma amostra de *E. coli* DH10Bac Δ CC com o plasmídeo recombinante *pFastBac1-GP64-musIL-10R1*. Após a incubação, a amostra foi semeada em meio LB agar-kan-tet-gen-IPTG-X-Gal para obtenção de colônias azuis e brancas. Destas colônias, apenas as brancas possuem o inserto de interesse transferido para o bacmídeo no segmento de DNA codificante do fragmento alfa da beta-galactosidade. Para confirmação do fenótipo uma colônia branca foi semeada em placa de petri contendo meio LB agar-kan-tet-gen-IPTG-X-gal, dando origem a inúmeras colônias brancas.

Para confirmação da transposição do segmento de interesse, uma amostra do bacmídeo recombinante extraído de uma colônia branca foi usada como molde para PCR. A reação foi feita com oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam os sítios *Tn7L* e *Tn7R* do bacmídeo. Para avaliação do produto da PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 1% e pode-se observar uma banda de DNA com aproximadamente 3.139 pb (Figura 14), correspondente ao segmento de DNA transferido do *pFastBac1* (2300 pb) contendo o inserto GP64-musIL-10R1 (839 pb), indicando que a transposição e obtenção do bacmídeo recombinante AcBac Δ CC-*GP64-musIL-10R1* foi realizada com êxito.

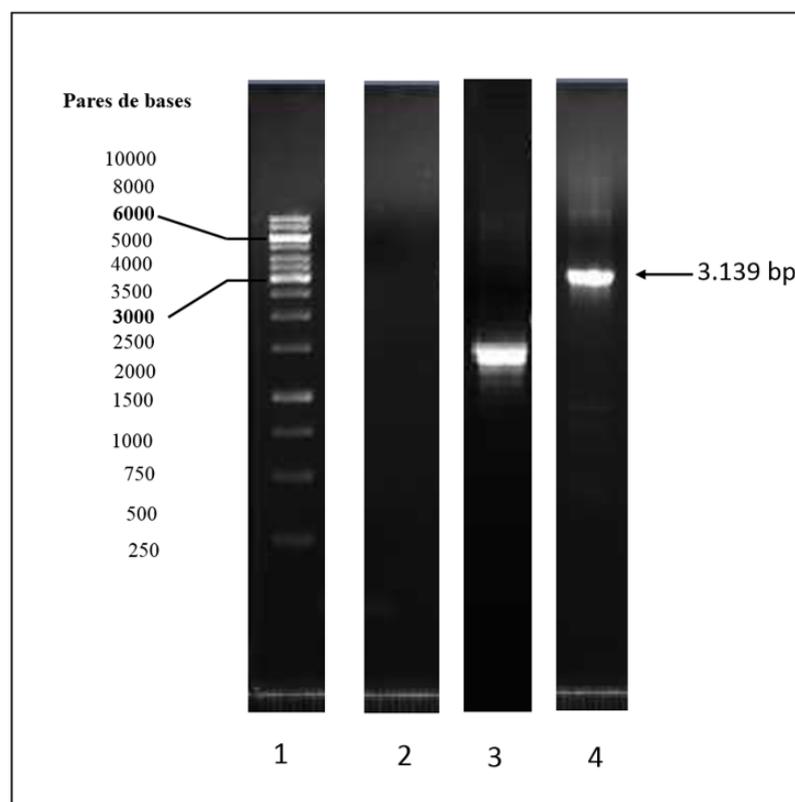


Figura 14: Avaliação do produto de PCR de bacmídeo por eletroforese em gel de agarose. Produto de PCR realizada com oligonucleotídeos iniciadores que flaqueiam os sítios Tn7R e Tn7R e bacmídeo extraído de uma colônia branca de *E. coli* DH10BAC Δ CC com fenótipo confirmado transformada com *pFastBac1-GP64musIL-10R1* foi avaliado em um gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio por eletroforese. Raias: 1) marcador de pares de bases (pb), 2) produto de PCR em reação com água (controle), 3) produto de PCR em reação com DNA de bacmídeo *pFastbac1* (controle) e 4) produto de PCR em reação com DNA de bacmídeo *pFastbac1-GP64-rmusIL-10R1*. Seta indica banda de DNA com cerca de 3139 pb, correspondente ao segmento de DNA transferido do *pFastBac1* (2300 pb) contendo o inserto *GP64musIL-10R1* (839 pb).

5.3.2 Obtenção de estoque viral para a produção de proteína recombinante

Para gerar o baculovírus recombinante e obter o estoque viral para produção da proteína recombinante, células Sf-9 foram transfectadas, inicialmente, com bacmídeo recombinante AcBac Δ CC-*GP64-musIL-10R1* em lipofectamina e, depois, infectadas com partículas virais usando-se MOI 0,1. Os sobrenadantes resultantes da transfecção (P1) e da infecção (P2) foram titulados pelo método de diluição limitante e exibiram o título de $2,4 \times 10^7$ /mL em um volume de 2 mL e $2,9 \times 10^8$ /mL em um volume de 100 mL, respectivamente.

5.3.3 Produção da *rmusIL-10R1*

Visando determinar a melhor condição para a produção da proteína recombinante foi realizado o ensaio de otimização em células High-Five. Para isso, as células foram inoculadas com *AcBac Δ CC-GP64-musIL-10R1* a diferentes MOI's (2, 5 e 10) e a diferentes tempos de infecção (TOI- 24, 48 e 72 h) para avaliar a melhor expressão da proteína recombinante pelo ensaio de *dot-blot*, utilizando para isso anticorpo monoclonal de camundongo antihistidina na região c-terminal, conjugado a fosfatase alcalina. Sobrenadante de células High-Five foram inoculadas com *AcBac Δ CC-pBastBac1* com MOI 10 para ser usado como controle negativo.

No ensaio de *dot-blot*, a membrana de nitrocelulose não exibiu sinal para o sobrenadante de 24 h de cultura com células infectadas com *AcBac Δ CC-pBastBac1* (controle negativo) com MOI 10 ou baculovírus recombinante *AcBac Δ CC-GP64-musIL-10R1*, independentemente do MOI utilizado, indicando a ausência de produção da proteína recombinante, nestas condições. Porém, a membrana revelou um discreto sinal do sobrenadante de 48 h de cultura pós-infecção com MOI 2, 5 e 10, e este sinal apresentou-se mais intenso no sobrenadante de 72 nos MOI's 2, 5 e 10, mostrando a produção da proteína recombinante. A condição resultante da maior produção da proteína recombinante foi de 72 h de cultivo pós-infecção e MOI's 2, 5 e 10 (Figura 14). A partir destes resultados, a condição escolhida para a produção da proteína *rmusIL-10R1* foi de MOI 5 e TOI 72 h.

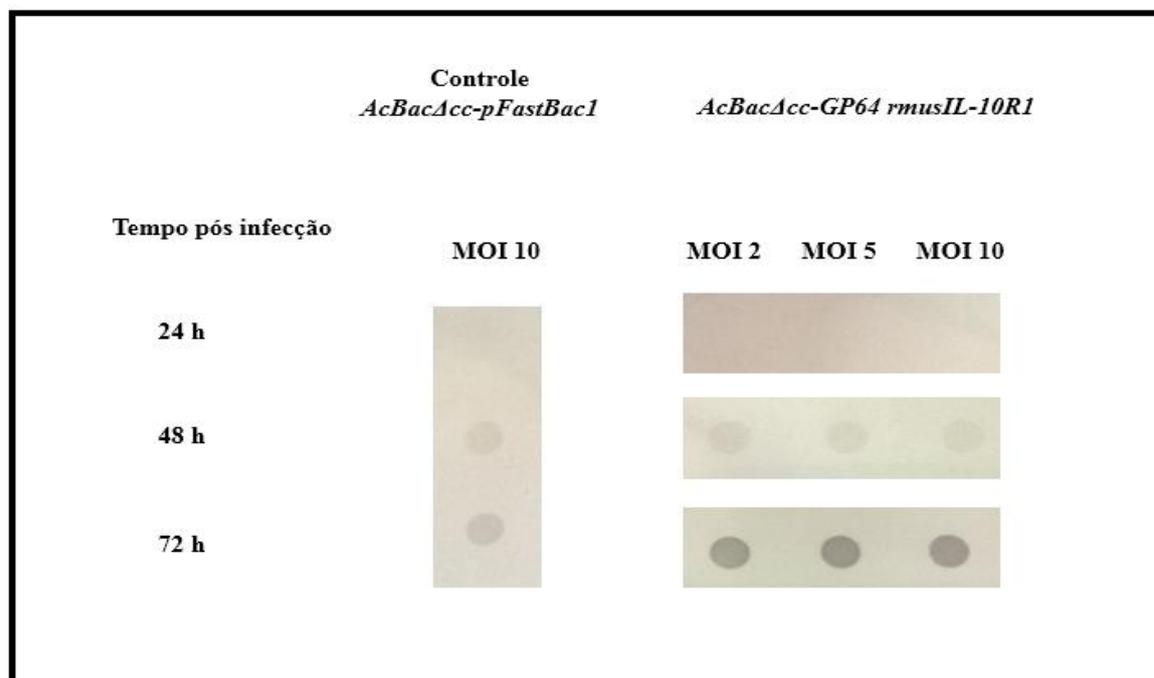


Figura 15: Ensaio de otimização da expressão de rmusIL-10R1 em células High-Five infectadas pelo baculovírus recombinante *AcBACΔCC-rmusIL-10R1*. Os sobrenadantes de cultura de células High-Five infectadas com baculovírus *AcBacΔCC-pFastBac1* (controle negativo) com MOI 10 e *AcBacΔCC-GP64-musIL-10R1* com MOI 2, 5 ou 10 pelo tempo de infecção de 24, 48 ou 72 h foram avaliados na membrana de nitrocelulose por dot blot. A membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina na região c-terminal, conjugado a fosfatase alcalina.

5.3.3.1 Avaliação da produção e purificação da rmusIL-10R1

As frações cromatográficas foram analisadas por SDS-PAGE corado com azul de Coomassie e apresentou uma banda com peso molecular médio de 38,9 kDa (Figura 15), além de duas discretas bandas que possivelmente representam isoformas glicosiladas da proteína rmusIL-10R1 com peso molecular de 42,6 kDa (banda mais fraca em cima da mais forte) e de 36,3 kDa (banda mais fraca abaixo da mais forte), levando em consideração que o peso molecular predito da proteína madura é de 26,8 kDa.

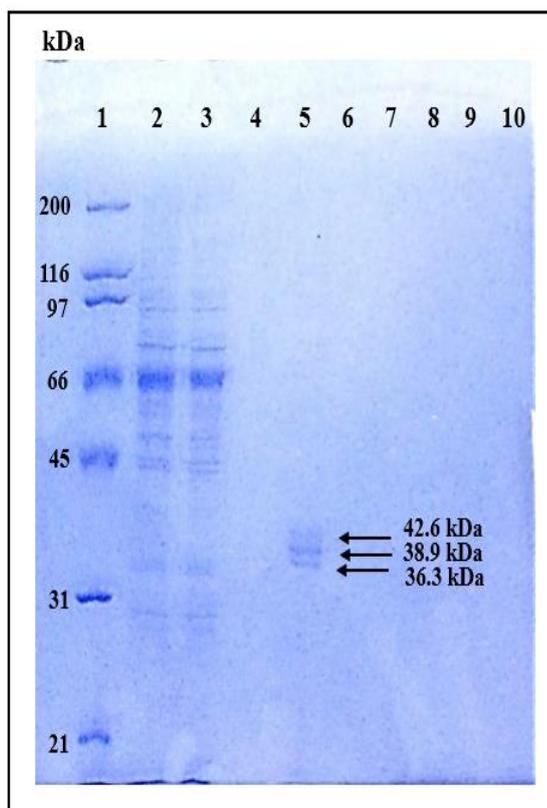


Figura 16: Avaliação da purificação do receptor solúvel de IL-10 murino recombinante (rmusIL-10R1) por eletroforese em gel de poliacrilamida. O sobrenadante da cultura de células High-Five infectadas com o baculovírus recombinante (*AcBac Δ CC-GP64-musIL-10R1*), utilizando o MOI 5 e TOI de 72h foi dialisado contra PBS e purificado por cromatografia de afinidade. As frações cromatográficas foram analisadas por SDS-PAGE. Na Raia 1: marcador de peso molecular; raia 2: Amostra do sobrenadante de cultura infectada com o baculovírus *AcBac Δ CC-GP64-musIL-10R1* dialisado contra PBS antes da purificação (afluente), aplicada na coluna; raia 3: amostra do efluente; raia: 5 fração da eluição referente ao rmusIL-10R1 purificado, bandas indicadas pela seta na figura.

Após a purificação, a fração cromatográfica passou por uma troca de tampão para PBS utilizando uma coluna de gel de filtração e a determinação da concentração protéica foi realizada pelo método do ácido binciconínico (Micro BCA), estimando-se um rendimento de 678 μ g de proteína recombinante para cada litro de cultura de células infectadas com o baculovírus *AcBac Δ CC-GP64-musIL-10R1*.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE RMUSIL-10R1 PRODUZIDA EM CÉLULAS HIGH-FIVE INFECTADAS COM BACULOVÍRUS RECOMBINANTE

Neste trabalho, as células cultivadas apenas com meio de cultura e com meio de cultura contendo 10 % de T-Stim apresentaram média de DO de 0,339 e 1,225, respectivamente, obtendo uma diferença de 0,886 entre a DO das células com estímulo e células cultivadas apenas com meio de cultura. As células cultivadas com 0,5 ng/mL de IL-10 recombinante murina (rmIL-10) apresentaram DO de 0,700, mostrando que rmIL-10 foi capaz de estimular a proliferação das células MC/9 quando comparadas com o controle negativo. Porém, ao cultivar as células com a combinação de 0,5 ng/mL de rmIL-10 e 4 µg/mL do rmusIL-10R1 não foi possível observar redução da proliferação, apresentando uma DO de 0,711, similar às células cultivadas com 0,5 ng/mL de rmIL-10 (Figura 17). Estes dados sugerem que a proteína rmusIL-10R1 não foi capaz de se ligar a IL-10 e realizar o bloqueio da sua sinalização.

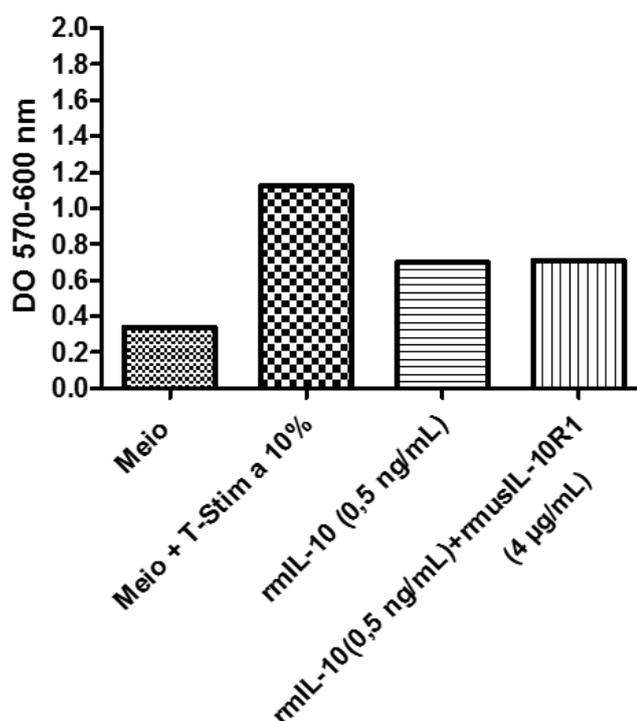


Figura 17: Avaliação da atividade biológica do receptor solúvel de IL-10 murino recombinante (rmusIL-10R1) em mastócitos da linhagem MC/9. A avaliação da atividade biológica do rmusIL-10R1 foi realizada através da análise da proliferação de células MC/9, por meio da determinação da DO. As células foram cultivadas nas seguintes condições: apenas com meio; meio com T-stim a 10%; com musIL-10 (0,5 ng/mL); e com musIL-10 (0,5 ng/mL) e rmusIL-10R1(4 µg/mL). Os dados representam os valores da média e desvio padrão da diferença entre a DO 570 nm e 600 nm.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho visou avaliar os efeitos imunomodulatórios do bloqueio da sinalização por IL-10 no curso da infecção por *Leishmania infantum/chagasi* em camundongos da linhagem BALB/c. Para isso, foi proposto um tratamento profilático, inicialmente, dos camundongos com substâncias imunomoduladoras utilizando duas ferramentas que promovessem o bloqueio da IL-10: plasmídeo que codifica a subunidade extracitoplasmática do receptor de IL-10 murino em associação ou não com plasmídeo codificante da IL-12 murina e a proteína recombinante correspondente à porção extracitoplasmática do receptor de IL-10 murino na forma solúvel produzida através do sistema baculovírus-célula de inseto.

Existem estratégias que visam promover o bloqueio da sinalização por IL-10 e em princípio, este bloqueio pode ser obtido pelo uso de anticorpos anti-IL-10, anti-receptor de IL-10 (anti-IL-10R), peptídios bloqueadores ou domínio extracitoplasmático de uma das duas cadeias do receptor de IL-10 denominada R1 (IL-10R1) (MURRAY, et al., 2002; MURRAY, 2005). A desvantagem do uso de anticorpos monoclonais produzidos em camundongos e peptídios no bloqueio da sinalização é que os primeiros devem ser eliminados rapidamente pelo sistema imune humano, e provavelmente canino, e os segundos exibem capacidade limitada de interferir na sinalização (CHAMES, et al., 2009; CARDONE, et al., 2011).

Na primeira etapa deste trabalho, foi proposto avaliar o bloqueio da IL-10 através do tratamento profilático de animais utilizando a terapia gênica com plasmídeos ideais para expressão em células de mamíferos codificantes do IL-10R1 e IL-12 murinos, e analisar seus efeitos e testar, posteriormente, em uma abordagem terapêutica. Segundo Marchi e colaboradores (2011), a combinação de IL-12 com uma ferramenta para bloqueio de IL-10 mostra-se mais eficaz na indução de polarização de linfócitos T para Th1 do que qualquer um dos dois elementos isoladamente.

A injeção dos plasmídeos foi feita em combinação com a técnica de eletroporação. Alguns autores demonstraram que aplicação de pulsos elétricos no local da injeção de plasmídeo com insertos permite a mobilização dos poros da membrana plasmática, otimizando a entrada dessas moléculas nas células podendo resultar em uma maior expressão da proteína codificada pelos insertos (DOWER et al. 1988, TAKETO et al. 1988, FOUNG et al. 1989, MELKONYAN et al. 1996, SOMIARI et al. 2000,

DRAGHIA-AKLI et al. 2003). As preparações dos plasmídeos, deste trabalho, apresentaram boa qualidade, de acordo com as análises realizadas como a densidade óptica a 260/280 nm superior a 1,8 e bandas bem definidas no gel de agarose, determinando a integridade destes plasmídeos.

A evolução da infecção visceral, nos camundongos, apresenta desfechos distintos no baço e no fígado (CERVIA, ROSEN e MURRAY, 1993; KAYE et al., 2004). No fígado, frente a uma infecção intracelular, a célula fagocítica que alberga o patógeno é circundada por células mononucleares que agem formando uma barreira em torno da célula-alvo desencadeando uma resposta granulomatosa, a qual limitará ou destruirá o agente infeccioso. A formação de granuloma é indicativa de expressão tecidual de resposta imune mediada por células (MURRAY, 2001). Neste trabalho, foi possível observar algumas alterações histológicas do tecido hepático dos animais tratados com os plasmídeos. Os principais achados foram infiltrado inflamatório no parênquima, presença e frequência de granulomas no parênquima e no espaço porta.

A intensidade do infiltrado inflamatório no parênquima hepático apresentou-se distinta nos cinco grupos. Os animais que receberam somente plasmídeo contendo o inserto para IL-12 (pcDNA3.1mIL-12) e animais que receberam a combinação dos dois plasmídeos (pcDNA3.1mIL-12 + pcDNA3.1mIL-10R1) apresentaram intensa infiltração inflamatória no parênquima com predominância de células mononucleares, como linfócitos e macrófagos. A IL-12 é uma citocina que possui a capacidade de induzir resposta imune do tipo celular (Th1) (BLISS, et al., 1996; WATANABE, 1999), porém, neste estudo, observou-se que a administração desta citocina nas condições pré-determinadas gerou efeitos intensos para o tecido. A injeção de plasmídeos, codificando a proteína recombinante, seguida de eletroporação pode levar a um aumento na expressão e produção desses peptídeos *in vivo* (LUCAS e HELLER, 2001). No grupo de animais que recebeu somente pcDNA3.1mIL-10R1 e nos grupos controles (salina e pcDNA3.1) a intensidade do infiltrado inflamatório no parênquima hepático foi moderada.

A presença e frequência de granulomas no parênquima hepático também variaram entre os grupos, os animais que receberam IL-12 isoladamente ou combinada com plasmídeo que codifica o receptor de IL-10, apresentou formação de granuloma com aspecto maduro, sendo possível observar, através da microscopia óptica, uma

discreta presença de amastigotas, chegando a ser ausente em muitos granulomas observados. Já nos grupos controles e no grupo que recebeu apenas pcDNA3.1mIL-10R1 a frequência foi moderada, sendo possível observar com facilidade parasitos no interior dos macrófagos de forma discreta a intensa. Este achado pode indicar que apesar de IL-12 promover uma resposta inflamatória intensa, provavelmente, pode ter sido capaz de induzir a produção de IFN- γ e assim ativar os macrófagos a destruir os parasitos em seu interior. Foi observada por Lucas e Heller (2001), uma produção de quase 250 pg/mL de interferon gama no soro de camundongos, sete dias após da aplicação do plasmídeo codificando IL-12 murina.

A combinação com o receptor de IL-10 murino não apresentou efeito, indicando que a quantidade administrada do pcDNA3.1mIL-10R1 não promoveu a resposta esperada, já que os animais que receberam pcDNA3.1mIL-10R1 isoladamente apresentou resultado similar aos animais controles (salina e pcDNA3.1). Apesar disso, neste grupo de animais foi possível observar granulomas organizados e maduros. Murray e colaboradores, em 2002, observaram que camundongos BALB/c IL-10 knockouts apresentaram granulomas maduros 4 semanas após a infecção com *L. donovani*.

No que diz respeito à presença de granulomas nos espaços portais, animais que receberam somente IL-12 apresentaram presença granulomatosa em torno destes vasos de forma intensa, efeito esperado devido à administração de IL-12 (SANTOS, 2007).

No experimento realizado, neste trabalho, observou-se que no baço de todos os animais o folículo apresentou aspecto organizado e carga parasitária discreta. Isso pode estar relacionado com o fato de que, neste órgão, o pico parasitário é mais lento em comparação com a evolução do parasitismo no fígado e, pelo tempo do experimento, não foi possível observar a desestruturação de sua arquitetura, a qual é observada a partir de 60 dias de infecção (NIETO, 2011; YURDAKUL et al., 2011). O grupo de animais que foi administrado somente com pcDNA3.1mIL-12 apresentou uma esplenomegalia em comparação com os demais grupos. O desenvolvimento de esplenomegalia nestes camundongos decorreu, possivelmente, da expansão da polpa vermelha, o que pode ser observado na análise histológica do baço destes animais. Alguns autores observaram esplenomegalia associada com aumento de hematopoiese extramedular, em camundongos injetados com IL-12 (GATELY et al. 1994, TARE et al.

1995), o que foi observado, neste trabalho, nos grupos G3 (pcDNA3.1mIL-12) e G5 (pcDNA3.1mIL-12 + pcDNA3.1mIL-10R1). O tamanho do centro germinativo dos animais que receberam IL-12 somente ou em combinação com IL-10R1 foi maior em comparação aos demais grupos, este achado pode estar relacionado com uma maior atividade linfocitária decorrente da administração de IL-12.

Segundo Murray e colaboradores (2005), a inibição da sinalização por IL-10 favorece ao desenvolvimento de uma resposta celular Th1, secreção de interferon gama, formação de granuloma, ativação da atividade leishmanicida dos macrófagos e uma melhor sinergia com imunoterápico. Atualmente, tratamento em humanos é à base de quimioterápicos e algumas abordagens na LV têm incluído a coadministração de IL-12 com antimônio pentavalente (MURRAY, et al., 2005). A IL-12 pode induzir a secreção de IFN- γ que pode ativar macrófagos a destruir as leishmanias em seu interior, melhorando a eficácia e a durabilidade do efeito do quimioterápico (MURRAY, et al., 2005). Neste trabalho foi utilizada a administração do receptor de IL-10 murino, como possível agente imunomodulador da resposta imune frente à infecção por *L. infantum/chagasi*, em combinação com IL-12. Os animais administrados com a combinação das duas substâncias imunomoduladoras, aparentemente, conseguiram controlar a carga parasitária em relação a todos os outros grupos. Porém este resultado se deve à administração somente de IL-12, não sendo possível observar este controle no grupo de animais que recebeu somente o receptor de IL-10, demonstrando uma progressão da infecção. Marchi e colaboradores (2011), ao avaliarem os efeitos do bloqueio da IL-10 em um modelo de melanoma em camundongos da linhagem C57BL/6 observaram que os animais administrados com plasmídeo codificando receptor de IL-10 (pcDNA3.1mIL-10R1, mesmo plasmídeo utilizado neste trabalho) apresentaram taxa de sobrevivência maior e que esta resposta foi intensificada com a coadministração de plasmídeo codificando IL-12. Neste presente trabalho não foi possível observar os efeitos do bloqueio da IL-10 utilizando apenas o pcDNA3.1mIL-10R1, possivelmente a dose administrada e o tempo de tratamento, bem como o número de animais precisam ser reavaliados para melhor compreensão dos seus efeitos.

Com o intuito de avaliar o efeito do bloqueio da IL-10 como agente imunomodulador em camundongos com leishmaniose visceral para posteriormente compreender seus efeitos em cães, neste trabalho, foi concebida uma construção de

DNA que codifica *rmusIL-10R1* juntamente com a sequência líder da glicoproteína GP64 do AcMNPV que foi inserida no cromossoma artificial do baculovírus, para assim gerar baculovírus recombinante. A proteína recombinante foi produzida e purificada a partir de células de inseto infectadas com baculovírus recombinante com um rendimento em torno de 678 µg por litro de cultura. A proteína *rmusIL-10R1* não mostrou-se capaz de bloquear a sinalização por IL-10 no ensaio *in vitro* utilizando mastócitos da linhagem MC/9.

A construção de DNA para a produção de *rmusIL-10R1* foi elaborada utilizando-se elementos capazes de promover a secreção ou tradução da proteína como a sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo sinal da proteína GP64 do AcMNPV, sequência de nucleotídeos que codificam *rmusIL-10R1* com códons otimizados para a espécie de mariposa *Trichoplusia ni* e uma cauda de seis histidinas para favorecer a purificação. Para facilitar o processo de produção da proteína recombinante foi utilizada a sequência líder de AcMNPV GP64, a glicoproteína encontrada em abundância no envelope viral e, além disso, tem o papel de orientar o processo de produção para o retículo endoplasmático e assim, garantir que a liberação da proteína não seja feita no citosol (WHITFORD et al., 1989; ALBERTS et al., 2010).

A otimização de códons de construções de DNA leva a uma maior produção de proteínas em células homólogas quando comparada com sequências que não passaram pelo processo de otimização de códons (GUSTAFSSON et al., 2004; FATH et al., 2011). Em estudos prévios, em nosso laboratório, foi produzida e purificada a proteína recombinante correspondente ao receptor de IL-10 canina, concebida com as mesmas condições que a proteína em estudo, e foi observado um rendimento de 2,8 mg por litro de cultura (SANTOS, 2016). Também, em nosso laboratório, foram produzidas, através deste sistema, proteínas correspondentes a IL-2, IL-12 e IL-7 caninas e o rendimento obtido foi superior a 5 mg por litro de cultura, rendimentos superiores ao obtido com *rmusIL-10R1* (678 µg/L). Segundo O'Reilly e colaboradores (1994), a eficiência da expressão de diferentes genes no sistema baculovírus pode ser variável.

Para facilitar a purificação da proteína foi acrescentada uma cauda de seis histidinas na extremidade carboxila da proteína, a qual apresenta baixa imunogenicidade e é rara a sua interferência na estrutura e função da proteína (CHAGA et al., 1999; GABERC-POREKAR; MENART, 2001).

A avaliação da purificação de rmusIL-10R1 foi feita por SDS-PAGE em gel corado por azul de Coomassie, revelando 3 bandas de proteínas com peso molecular de 42,6, 38,9 e 36,3 kDa, sendo a do meio (38,9 kDa) a mais intensa. A presença de uma banda fraca abaixo e acima da banda de 38,9 kDa sugere ser referente a isoformas glicosiladas da proteína rmusIL-10R1, já que células de inseto promovem diferentes tipos de modificações pós-traducionais, como a glicosilação, portanto, não é incomum observar tais bandas no gel quando a proteína é expressa em células de inseto (SHI et al., 2007). O peso predito da proteína deste estudo é de 26,8 kDa. O tamanho observado no gel foi maior, provavelmente, devido ao processo de glicosilação, uma modificação pós-traducional. Este processo implica na ligação covalente entre moléculas de glicose e aminoácidos de uma proteína (SILVA, 2014).

A IL-10 é capaz de induzir a proliferação de mastócitos da linhagem MC/9 (THOMPSON et al., 1991). Por este motivo, esta linhagem celular foi utilizada para a avaliação da atividade biológica da proteína recombinante rmusIL-10R1, esperando-se que células cultivadas na presença de IL-10 murina, juntamente com rmusIL-10R1, apresentassem índice de proliferação reduzido. Mastócitos da linhagem MC/9 são derivados de células do fígado fetal de camundongos cultivados na presença de células de medula óssea irradiada e sobrenadante de esplenócitos estimulados com concanavalina A (NABEL et al., 1981). Células MC/9 somente proliferam na presença de estímulos. O estímulo utilizado para cultivar estas células (T-Stim), neste trabalho, foi obtido a partir de sobrenadante de esplenócitos de rato cultivados com concanavalina A, que induz a secreção de citocinas pelos esplenócitos, principalmente IL-2, IL-4, IL-10 e IL-13.

Com base nos dados obtidos, a proteína rmusIL-10R1 não inibiu a proliferação das células MC/9, sugerindo que a proteína não possui atividade funcional. Provavelmente, a ligação entre IL-10/rmusILL-10R1 foi fraca, o que permitiu que esta proteína competisse com os receptores da membrana dos mastócitos. Segundo Reineke e colaboradores (1997), para que o sinal de transdução por IL-10 seja desencadeado é necessária a formação do complexo composto por quatro moléculas de IL-10R1 ou IL-10R α com duas moléculas de IL-10 (homodímero), ou seja, para cada molécula de IL-10 são necessárias duas moléculas de IL-10R1.

Diversos fatores podem ter influenciado para a ineficácia da ligação do receptor à molécula de IL-10. Segundo Yoon e colaboradores (2006), o equilíbrio de determinadas constantes cinéticas, como a constante de dissociação, é importante para a interação entre a IL-10 e o IL-10R1.

O baixo rendimento obtido no processo de produção de rIL-10R1 pode ter influenciado na função biológica da proteína. O baixo nível de expressão de proteínas pode estar ligado a sua instabilidade (O'REILLY et al., 1994).

7 CONCLUSÃO

A administração de plasmídeos codificadores do receptor de IL-10R1 em associação com IL-12 apresentou efeitos tanto no fígado, no que diz respeito à formação de granulomas com ausência ou discreto parasitismo e infiltrado inflamatório, quanto no baço dos animais que apresentaram tamanho do centro germinativo maior do que os animais dos grupos controles e do grupo administrado apenas com pcDNA3.1m IL-10R1, indicando aumento da atividade linfocitária. Estes efeitos podem ser atribuídos somente à ação da IL-12 e não do receptor de IL-10. A proteína recombinante r_{mus}IL-10R1 produzida no sistema baculovírus célula de inseto não apresentou atividade funcional.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- Diante dos dados prévios apresentados nesta primeira parte do trabalho, a administração dos plasmídeos, no que diz respeito à quantidade e número de doses administradas, precisa ser otimizada, bem como ampliar o número de animais do experimento.
- É necessária a realização de análises posteriores para avaliar se a proteína produzida no sistema baculovírus-célula de inseto sofreu alguma modificação em sua estrutura e se esta modificação alterou a estabilidade da ligação com a citocina.
- Dessa forma, após redefinir o desenho experimental será possível avaliar melhor a ação da proteína na neutralização da IL-10 e assim, extrapolar o experimento para o modelo canino.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed., Rio de Janeiro: Elsevier. 2008. 564p.

ALBERT, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 728p.

ALVARENGA, D. G. de, et al. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43 n. 2, p. 194-197, 2010.

ANDRADE, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (*L. chagasi*) in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 181, p. 83-90, 2011.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy- Review of a new approach. **Pharm. Rev.**, v. 55, p. 241-269, 2003.

BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 75, n. 1, 2005.

BLACKWELL, J. M.; PLANT, J. E. Expression of the natural resistance gene (*Lsh*) in wild mice infected experimentally with *Leishmania donovani* or *Salmonella typhimurium*. **Curr. Top. Microbiol. Immun.**, p. 323-330, 1986.

BLACKWELL, J. M. et al. SLC11A1 (formely NRAMPI) and disease resistance. **Cel. Microbiol.**, v. 3, p. 773-784, 2001.

BLISS, J. et al. IL-12, as an adjuvant, promotes a T helper 1 cell, but does not suppress a T helper 2 cell recall response. **J. Immunol.**, v. 156, p. 887-894, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. 120p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2014. 120p.

CAR, B. D. et al. The toxicology of interleukin-12: A Review. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, n. 1, p. 58-63, 1999.

- CARDONE, A. et al. Peptide-based inhibitor of interleukin-10 or interferon-gamma signaling. United States of America: **Offi. USPaT**, v. PCT/US2011/036010, 2011.
- CARVALHO, E. M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 3, p. 535-540, 1992.
- CERVIA, J. S.; ROSEN, H.; MURRAY, H. W. Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 4, p. 1330-1333, 1993.
- CHAGA, G.; HOPP, J.; NELSON, P. Immobilized metal ion affinity chromatography on Co²⁺-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. **Biot. Appl. Bioche.**, v. 29, n. 1, p. 19-24, 1999.
- CHAMES, P. et al. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. **Br. J. Pharmacol.**, v. 157, n. 2, p. 220-233, 2009.
- CIARAMELLA, P., et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 539-543, 1997.
- DAVIES, C. R. et al. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ**, v. 326, p. 377- 82, 2003.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.
- DOWER, W. J.; MILLER, J .F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res**, v. 16, n. 13, p. 6127-6145, 1988.
- DRAGHIA-AKLI, R. et al. Effects of plasmid-mediated growth hormone releasing hormone supplementation in young, healthy Beagle dogs. **J. Anim. Sci.**, v. 81, n. 9, p. 2301-2310, 2003.
- FATH, S. et al. Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression. **PLoS One**, v. 6, n. 3, 2011.
- FORATTINI, O. P. Algumas observações sobre biologia de flebótomos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do rio Paraná (Brasil). **Arq. Fac. Hig. Saude Públ.**, v. 8, n. 1, 1954.
- FOUNG, S.K.; PERKINS, S. Electric field-induced cell fusion and human monoclonal antibodies. **J. Immunol. Methods**, v. 116, n. 1, p. 117-122, 1989.

- FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasit.**, v. 137, n. 3-4, p. 214-221, 2006.
- GABERC-POREKAR, V.; MENART, V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **J. Biochem. Bioph. Meth.** v. 49, n. 1, p. 335-360, 2001.
- GALATI, E.A.B., et al. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Públ.**, v. 31, n. 4, p. 378-390, 1997.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, 2004.
- GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 687-695, 1998.
- GRAMICCIA, M., GRADONI L.; ORSINI S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 86, p. 613-620, 1992.
- GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends Immunol.** v. 22, n. 7, p. 346-53, 2004.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.
- JANKOVIC, D.; KUGLER, D. G.; SHER, A. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. **Muco. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 239-246, 2010.
- JEANNIN, P. et al. IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. **J. Immunol.**, v. 156, p. 3159-3165, 1996.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature**, v. 9, 2011.
- KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.**, v.201, p.239-253, 2004.
- KOTENKO, S.V. et al. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. **EMBO J.**, v. 16, p. 5894-5903, 1997.
- KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 5, p. 376-383, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil- A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LAINSON, R. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LEHMANN, J. et al. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to *Leishmania donovani* infection in mice. **J. Interf. Citok. Res.**, v. 20, n.1, 2004.

LEWIS, D. J. Phlebotomid sandflies. **Bull. Wld. Hlth. Org.**, v. 44, p. 535-551, 1971.

LUCAS, M. L.; HELLER, R. Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. **Mol. Ther.**, v. 3, n. 1, p. 47-53, 2001.

LUKES, J, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

MACATONIA, S.E., et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v. 154, n. 10, p. 5071-5079, 1995.

MANNA, L. et al. Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. **The Vet. J.**, v. 182, p. 441-445, 2009.

MARCHI, LH. et al. Gene therapy with interleukin-10 receptor and a protective interferon- γ -dependent response against B16F10-Nex2 melanoma. **Cân. Gen. Ther.**, v. 18, n. 2, p. 110-122, 2011.

MARZOCHI, M. C de A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 359-375, 1994.

MAURICIO, I. L., et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 03, p. 237-246, 1999.

MEHROTRA, P.T., et al: Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. **J. Immunol.**, v. 160, n. 6, p. 2637-2644, 1998.

- MELKONYAN, H., et al. Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO). **Nucleic Acids Res.**, v. 24, n. 21, p. 4356-4357, 1996.
- MIRALLES, G. D., et al. Th1 and Th2 Cell-Associated Cytokines in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 3, p. 1058–1063, 1994.
- MORENO, J. et al. A resposta imune e subconjuntos de PBMC na leishmaniose visceral canina antes, e depois, a quimioterapia. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.71, n.3-4, p.181-195,1999.
- MURRAY, H. W., et al. Treatment of experimental visceral leishmaniasis in a T-cell-deficient host: response to amphotericin B and pentamidine. **Antim. Ag. Chemot.**, v. 37, n. 7, p. 1504- 1505, 1993.
- MURRAY, H. W. Endogenous Interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 175, p. 1477-1479, 1997.
- MURRAY, H. W., et al. Behavior of Visceral. **Infection**, v. 185, n. 5, 1997.
- MURRAY, H.W., HARIPRASHAD, J.: Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 1, p. 387-391, 1995.
- MURRAY, H.W. et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect. Immun.**, v.70, n.11, p.6284-6293, 2002.
- MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, p. 249-267, 2001.
- MURRAY, H. W. et al. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 458-464, 2003.
- MURRAY, H. W. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 6, p. 787–794, 2004.
- MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** v. 174, n. 8, p. 4916-4923, 2005.
- MURRAY, H. W. et al. Antagonizing Deactivating Cytokines To Enhance Host Defense and Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Infect. Immun.** v. 73, n. 7, p. 3903-3911, 2005.

MURRAY, H. W. Review: Leishmaniasis in the United States: Treatment in 2012. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 3, p. 434-440, 2012.

NABEL, G., et al. Inducer T lymphocytes synthesize a factor that stimulates proliferation of cloned mast cells. **Nature**, v. 28, n. 291, p. 332-334, 1981.

NANDAN, D. et al. Myeloid cell IL-10 production in response to leishmania involves inactivation of glycogen synthase kinase-3 β downstream of phosphatidylinositol-3 kinase. **J. Immunol.**, v. 188, p. 367-378, 2011.

NIETO, A., et al. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model, **Vet. Res.**, v. 42, n. 39, 2011.

NYLEN; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

O'GARRA, A., et al: Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunol. Rev.**, v. 223, p. 114-131, 2008.

O'REILLY, D. R. et al. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. 4^a ed., USA: Oxford University Press. 1994. 347p.

PIERSON, W; LISTON, A. A new role for interleukin-10 in immune regulation. **Immun. Cel. Biol.**, v. 88, p. 769-770, 2010.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, n.1, p.229-235, 1994.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.** v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.

PORROZZI, R.; CAVALCANTI, A. dos S.; CUPOLILLO, E. Modelos experimentais na Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p. 277-286.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad. Saúde. Públ.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2948-2952, 2008.

REINEKE, U. et al. Mapping of the interleukin-10/interleukin-10 receptor combining site. **Prot. Sci.**, v. 7, p. 951-960, 1997.

RHALEM, A., et al. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.71, n.1, p.69-76, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, P. O. M. **Avaliação da resposta imune em cães após imunização com dois antígenos recombinantes de *Leishmania chagas/L. infantum* em associação a interleucina 12 (IL-12) canina**. 100 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

SANTOS, C. O. **Produção e avaliação do receptor solúvel de IL-10 canina recombinante**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)- Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

SAVANI, E. S. M. M. et al. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania spp.* in cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Vet. Parasit.**, v. 160, p. 18-24. , 2009.

SHI, X.; JARVIS, D. L. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system. **Cur. Dru. Targ.**, v. 8, n. 10, p. 1116-25, 2007.

SHOUVAL, D. S. et al. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. **Adv. Immunol.**, v. 122, 2014.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev. Tróp. Ciênc. Agrá. Biol.**. v. 1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, A. **Proteínas Glicosiladas. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 2014. 8 p.

SILVA, C. G., et al. Ultraestrutura de parasitos do gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p. 53-67, 2014.

SOMIARI, S. et al. Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. **Mol. Ther.**, v. 2, n. 3, p. 178-187, 2000.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immun. Cel. Bio.**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.

TAKETO, A. DNA transfection of Escherichia coli by electroporation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 949, n. 3, p. 318-324, 1988.

THOMPSON-SNIPES, L. et al. Interleukin 10: A novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 507-510, 1991.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

VIDAL, S. et al. Cloning and characterization of a second human NRAMP gene on chromosome 12q13. **Mammalian Genome**, v. 6, p. 224-230, 1995.

VILELA, M. L., et al. Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis: fatores associados ao processo de expansão e urbanização da leishmaniose visceral americana. In:

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C.R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p. 183-192.

WATANABE, M. et al. Intradermal delivery of IL-12 naked DNA induces systemic NK cell activation and Th1 response in vivo that is independent of endogenous IL-12 production. **J. Immunol.**, v. 163, n. 4, p. 1943-1950, 1999.

WHITFORD, M. A. R. C. et al. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. **J. Virol.** v. 63, n. 3, p. 1393-1399, 1989.

WHO. **Control of leishmaniasis, report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis**, Geneva, 22-26 March, 2010.

WHO. **Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014**. Geneva, 3 June, 2016.

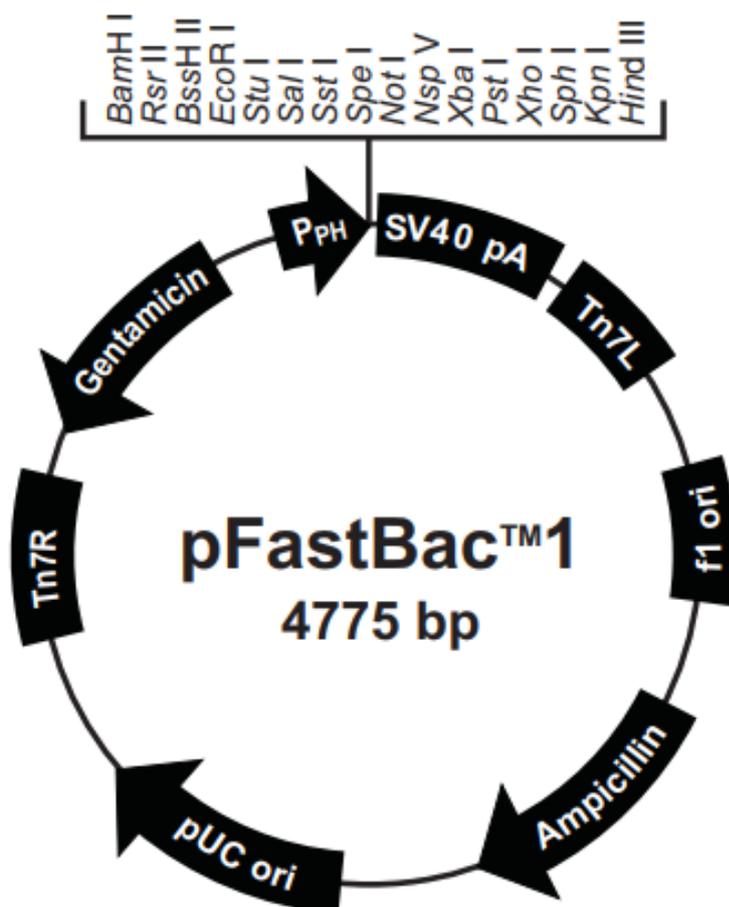
YOON, S. I. et al. Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. **J. Biol. Chem.**, v.281, n.46, p. 35088-35096, 2006.

YURDAKUL, P. et al. Compartment- specific remodeling of splenic micro- architecture during experimental visceral leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v. 179, v. 1, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1 – MAPA DOS PLASMÍDEOS

pFastBac1



Comments for pFastBac™1
4775 nucleotides

f1 origin: bases 2-457

Ampicillin resistance gene: bases 589-1449

pUC origin: bases 1594-2267

Tn7R: bases 2511-2735

Gentamicin resistance gene: bases 2802-3335 (complementary strand)

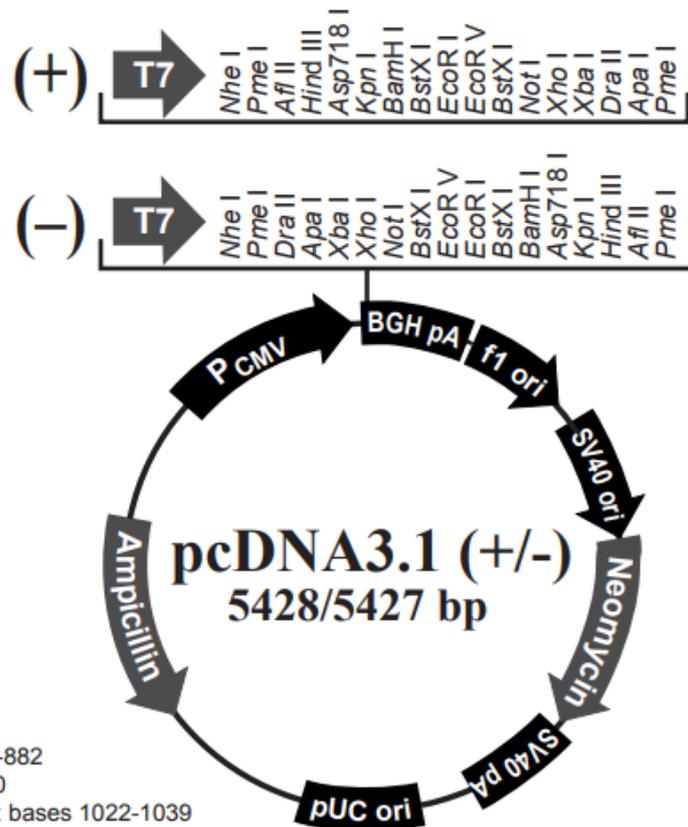
Polyhedrin promoter (P_{PH}): bases 3904-4032

Multiple cloning site: bases 4037-4142

SV40 polyadenylation signal: bases 4160-4400

Tn7L: bases 4429-4594

pcDNA3.1



Comments for pcDNA3.1 (+)
5428 nucleotides

CMV promoter: bases 232-819

T7 promoter/priming site: bases 863-882

Multiple cloning site: bases 895-1010

pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 1022-1039

BGH polyadenylation sequence: bases 1028-1252

f1 origin: bases 1298-1726

SV40 early promoter and origin: bases 1731-2074

Neomycin resistance gene (ORF): bases 2136-2930

SV40 early polyadenylation signal: bases 3104-3234

pUC origin: bases 3617-4287 (complementary strand)

Ampicillin resistance gene (*bla*): bases 4432-5428 (complementary strand)

ORF: bases 4432-5292 (complementary strand)

Ribosome binding site: bases 5300-5304 (complementary strand)

bla promoter (P3): bases 5327-5333 (complementary strand)