

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ADMINISTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICANTES DE IL-
12 E IL-2 EM CÃES E EXPRESSÃO DE IL-12 EM CÉLULAS
DE INSETO POR BACULOVÍRUS RECOMBINANTE**

Tiago Landim d'Avila

**Salvador – BA
2011**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

**ADMINISTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICANTES DE IL-
12 E IL-2 EM CÃES E EXPRESSÃO DE IL-12 EM CÉLULAS
DE INSETO POR BACULOVÍRUS RECOMBINANTE**

Tiago Landim d'Avila

Orientador: Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira

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

Salvador – BA
2011

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

L257a D'Avila, Tiago Landim
Administração de plasmídeos codificantes de IL-12 e IL-1 em cães e expressão de IL-12 em células de inseto por baculovírus recombinante.[manuscrito] / Tiago Landim
D'Avila. - 2011.
87 f.; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2011.
Orientador: Profº. Drº. Geraldo Gileno de Sá Oliveira.

1. IL-12. 2. Plasmídeo 3. Cães 4. BaculovirusI. Título

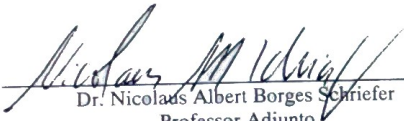
CDU 578.841

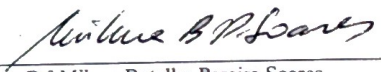
“ADMINISTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICANTES DE IL-12 E IL-2 EM CÃES E EXPRESSÃO DE IL-12 EM CÉLULAS DE INSETO POR BACULOVÍRUS RECOMBINANTE”

TIAGO LANDIM D'AVILA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO ORGANIZADORA


Dr. Nicolau Albert Borges Schriefer
Professor Adjunto
UFBA


Dr.^a Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisador Titular
CPqGM / FIOCRUZ

“A esperança brota eternamente
no peito do homem. Ele nunca é,
mas espera sempre ser feliz.”

Alexander Pope

Este trabalho é dedicado aos três pilares de sustentação da minha vida: minha mãe, minha avó e meu tio.

Agradecimentos

Este trabalho pode ser realizado graças a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram com conhecimento científico, no trabalho prático, na amizade e carinho, extremamente indispensáveis. Gostaria de demonstrar meu apreço pelo amparo e atenção, tanto dentro quanto fora do laboratório, durante estes anos.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira

Aos Dr. Lain C. P. de Carvalho, Dr. Washington L. C. dos Santos, Dra. Patrícia Veras.

Aos amigos do grupo de pesquisa:

Fabienne Petitinga, Marcelo Ribeiro, Bianca Paiva, Gustavo Saldanha, Cristiane Pinheiro, Naiara Carvalho, Laiz Paixão, Elivani Sacramento.

Aos amigos do laboratório:

David Garrido, Pablo Oliveira, Luciana Aragão, Virginia Silva, Micely Hermida, Joselli Silva, Viviane Junqueira, Isabela Navaro, Fernanda Orpinelli, Rodrigo Araujo, Lairton Borja, Isaac Queiroz, Antônio Petersen, Manuela Sòlca, Tarcila Pitanga, Isadora Lima,

Aos amigos do CPqGM:

Diego Menezes, Vanessa Azevedo, Antonio Nascimento, Ana Maria Fiscina

À família:

Maria Luzia, Maria de Lourdes, Hercules Filho, Helvídio Landim,

Aos animais, essência da experimentação.

D'AVILA, Tiago Landim. ADMINISTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICANTES DE IL-12 E IL-2 EM CÃES E EXPRESSÃO DE IL-12 EM CÉLULAS DE INSETO POR BACULOVÍRUS RECOMBINANTE. Dissertação – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

RESUMO

A interleucina-12 (IL-12) é uma glicoproteína heterodimérica, codificada por dois genes distintos co-expressados na mesma célula. IL-12 precisa ser glicosilada para exibir atividade funcional. Essa glicoproteína promove a diferenciação de células T e é capaz de estimular a proliferação de células T ativadas e células NK. Além disso, IL-12 promove a produção de IFN- γ por células NK e o aumento da atividade lítica de células NK e linfócitos T CD⁺ citotóxicos. Várias das atividades de IL-12 são desempenhadas ou são amplificadas pela associação com IL-2. Em nosso laboratório, foi gerada uma construção plasmideal capaz de expressar IL-12 canina, na forma de proteína de fusão de cadeia única (pcDNA3.1-scca-IL-12), e outra construção plasmideal capaz de expressar IL-2 canina (pcDNA3.1-ca-IL-2) em células de mamífero. Experimentos preliminares, a combinação de IL-12 e IL-2 expressas em sobrenadantes de células COS-7 mostrou-se capaz de promover produção de IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) de cães saudáveis. Visando a avaliação do potencial do uso de IL-12 e/ou IL-2 para o desenvolvimento de vacina ou método imunoterápico, no presente trabalho, grupos de cães saudáveis foram injetados três vezes, com intervalo de 2 dias entre cada duas doses consecutivas, com plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 e/ou pcDNA3.1-ca-IL-2 por via muscular por eletroporação. Em seguida, os cães foram submetidos à avaliação clínica, clínico-laboratorial (hemograma, determinação da concentração de transaminases, proteínas, ureia e creatinina no soro) e ensaios foram realizados para a detecção da expressão das proteínas recombinantes (sensibilização de CMNSP para produção de IFN- γ e determinação da concentração de IL-2 no soro). Não foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos de animais. Visando a produção de IL-12, células BTI-Tn-5B1-4 foram infectadas com

baculovírus recombinante contendo cDNA scca-IL-12 e capazes de adicionar uma cauda de 6 histidinas na extremidade carboxila. Para isso, duas construções diferentes em baculovírus foram elaboradas nesse laboratório, sendo uma delas no presente trabalho. Células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com as construções em baculovírus apresentaram a proteína recombinante: a) parcialmente degradada e em grande quantidade no sedimento celular e b) íntegra e em baixa quantidade no sobrenadante da cultura; de acordo com os resultados de obtidos por SDS-PAGE e *Western blot*.

Palavras-chave: Interleucina-12, Interleucina-2, cães, baculovírus.

D'AVILA, Tiago Landim. ADMINISTRATION OF THE PLASMID ENCODING IL-12 AND IL-2 IN DOGS AND EXPRESSION OF IL-12 IN INSECT CELLS BY RECOMBINANT BACULOVIRUS. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

ABSTRACT

Interleukin-12 (IL-12) is a heterodimeric glycoprotein, encoded by two distinct genes co-expressed in the same cell. IL-12 needs to be glycosylated to display functional activity. This glycoprotein promotes differentiation of T cells and is capable of stimulating proliferation of activated T cells and NK cells. In addition, IL-12 promotes IFN- γ production by NK cells and increased lytic activity of NK cells and cytotoxic T-lymphocyte CD +. Several of the activities of IL-12 are held or amplified by the association with IL-2. In our laboratory, a plasmideal construction was generated to express canine IL-12 like single-chain fusion protein (pcDNA3.1-scca-IL-12), and other construction to express canine IL-2 (pcDNA3.1-CA-IL-2) in mammalian cells. Preliminary experiments, the combination of IL-12 and IL-2 supernatants expressed in COS-7 cells was able to promote IFN- γ in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy dogs. To assess the potential of using IL-12 and/or IL-2 for the development of vaccine or immunotherapy method, in this study, groups of healthy dogs were injected three times with an interval of 2 days between each two consecutive doses with plasmid pcDNA3.1-scca-IL-12 and/or pcDNA3.1-ca-IL-2 intramuscularly by electroporation. Then the dogs were submitted to clinical evaluation, clinical and laboratory (blood count, determination of the concentration of transaminases, proteins, urea and serum creatinine) and tests were performed to detect the expression of recombinant proteins (PBMC sensitization to produce IFN- γ concentration and determination of serum IL-2). No differences were observed in all evaluated parameters between the groups of animals. Aiming the production of IL-12 cells, BTI-Tn-5B1-4 were infected with recombinant baculovirus containing cDNA scca-IL-12 and capable of adding a tail of 6 histidines at the carboxyl end. For this, two different constructs were prepared in our laboratory baculovirus, one of them in this work. Cells BTI-Tn-5B1-4 infected with the constructs presented in the recombinant baculovirus: a) partially degraded in large quantities in the sediment cell

and b) incorporates and in low quantities in the culture supernatant, according to the results obtained by SDS-PAGE and Western blot.

Keywords: Interleukin-12, Interleukin-2, dogs, baculovirus

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMNPV - *Autographa californica* “nuclear multiple polyhedrosis vírus”

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *Bovine serum albumin*)

cDNA – DNA complementar

CLMF – fator de maturação dos linfócitos citotóxicos (do inglês, *cytotoxic lymphocyte maturation factor*)

CMNSP – células mononucleares de sangue periférico

Con A – Concanavalina A

D.O. – Densidade óptica

EGFP – proteína verde fluorescente intensificada (do inglês *enhanced green fluorescent protein*)

ELISA – Ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

HBSS – Solução de sais de Hank tamponada (do inglês *Hank's Buffered Salt Solution*)

IFN- γ – interferon- γ

IPTG – Isopropyl- β -D-thiogalactoside

LAK – células assassinas ativadas por linfocinas (do inglês, *limphokine-activated killer cells*)

LAL – Lisado de amebócitos do *Limulus* (do inglês *Limulus Amebocyte Lysate*)

LB – Agar Luria Bertani

MOI – multiplicidade de infecção (do inglês, *multiplicity of infection*)

MOPS – Ácido morfolínico-fenil-sulfônico (do inglês *morpholinopropane sulfonic acid*)

NKSF – fator estimulatório de células NK (do inglês, *natural killer cell stimulatory factor*)

PBS – Tampão fosfato-salina (do inglês *phosphate buffered saline*)

pIL-12 – plasmídeo comercialmente vendido (pcDNA3.1) contendo a sequência codificante da IL-12 em cadeia única.

pIL-2 – plasmídeo comercialmente vendido (pcDNA3.1) contendo a sequência codificante da IL-2.

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR – transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

scca-IL-12 – IL-12 canina em cadeia única (do inglês *Single Chain Canine Interleukin-12*)

SLgp67-scca-IL-12EH – IL-12 canina em cadeia única (do inglês *Single Chain Canine Interleukin-12*) otimizada, contendo a sequência líder da proteína de baculovírus gp67 e um espaçador na região C-terminal entre a sequência codificante da proteína madura e a cauda de histidina.

SN – sobrenadante

TBS – tampão tris-salina (do inglês, *Tris Buffered Saline*)

TCGF – fator de crescimento de células T (do inglês, *T cell growth factor*)

TMB – tetrametilbenzidina

X-Gal – bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronograma do experimento com cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes caninas.	31
Figura 2 – Esquematização das sequencias presentes nos diversos baculovírus utilizados.	39
Figura 3 - Avaliação de plasmídeos por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio para a avaliação da pureza e integridade dos plasmídeos. ..	49
Figura 4 – Avaliações de temperatura (Figura 2A) e peso (Figura 2B) em cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes caninas.	50
Figura 5 – Níveis de hemoglobina presente nas hemácias de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes.	52
Figura 6 – Número de neutrófilos (Figura 6A) e linfócitos (Figura 6B) de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes.	54
Figura 7 – Níveis da enzima aspartato aminotransferase (Figura 7A) e da proteína albumina (Figura 7B) livres no soro de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes.	56

Figura 8 – Avaliação indireta da expressão de IL-12 através da estimulação da produção de IFN- γ por CMNSP de cães sensibilizados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-12 recombinantes.....59

Figura 9 – Avaliação da expressão de IL-2 circulante no soro de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes a partir da estimulação de células de linhagem sensíveis a presença de IL-2 (CTLL-2).....61

Figura 10 – Avaliação da purificação de sccaIL-12H por cromatografia de afinidade.....65

Figura 11 - Avaliação da purificação de sccaIL-12H por cromatografia de troca iônica.....66

Figura 12 - Avaliação da expressão de scca-IL-12EH em SDS-Page69

Figura 13 – Identificação de SLgp67-scca-IL-12EH por Western Blot específico α -Histidina.72

1.INTRODUÇÃO.....	17
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1.INTERLEUCINA-12 (IL-12)	20
2.2.INTERLEUCINA-2 (IL-2)	22
2.3.SINERGIA ENTRE IL-12 E IL-2.....	23
3.OBJETIVOS	25
3.1.GERAL:	25
3.2.ESPECÍFICOS:.....	25
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1.PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO CODIFICANTE DE IL-12 E IL-2 CANINAS.....	26
4.1.1. <i>Quantificação e avaliação dos plasmídeos de IL-12 e IL-2 recombinantes caninas</i>	28
4.1.2. <i>Mensuração da concentração de endotoxinas</i>	28
4.2.ANIMAIS	29
4.2.1. <i>Administração de plasmídeo por eletroporação</i>	29
4.2.2. <i>Parâmetros avaliados</i>	30
4.2.2.1.Avaliação clínica.....	30
4.2.2.2.Avaliação clínico-laboratorial	31
4.2.2.3.Avaliação da expressão de IL-12 e/ou IL-2.....	32
4.2.2.3.1.Avaliação da expressão de IL-12 nos cães.....	32
4.2.2.3.2.Avaliação da expressão de IL-2.....	35
4.3.EXPRESSÃO DE IL-12 POR CÉLULAS DE INSETO INFECTADAS DE POR BACULOVÍRUS RECOMBINANTE	36
4.3.1. <i>Construções elaboradas em baculovirus</i>	37
4.3.1.1.Infecção e coleta de hemolinfa de larvas de <i>H. virescens</i>	41
4.3.1.2.Purificação de IL-12 por cromatografia a partir de hemolinfa de larvas de <i>H. virescens</i>	42
4.3.2. <i>Expressão de IL-12 em células BTI-Tn-5B1-4 infectas por baculovirus recombinante.</i>	44
4.3.2.1.Avaliação da expressão por SDS-Page e identificação por Western Blot.....	45
5.RESULTADOS.....	47
5.1.ADMINISTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICANTES DE IL-12 E/OU IL-2 EM CÃES	47
5.1.1. <i>Produção dos plasmídeos codificantes de IL-12 e IL-2 recombinantes caninas</i>	47
5.1.2. <i>Parâmetros avaliados</i>	48
5.1.2.1.Avaliações clínicas	48
5.1.2.2.Avaliações clínico-laboratoriais.....	51

5.1.2.3.Expressão de citocinas	57
5.1.2.3.1.Avaliação da expressão in vitro de IFN- γ em CMNSP de cães administrados com plasmídeos.....	57
5.1.2.3.2.Avaliação da expressão de IL-2 em soro de cães administrados com plasmídeos	60
5.2.EXPRESSÃO DE IL-12 RECOMBINANTE CANINA EM CÉLULAS DE INSETO POR BACULOVÍRUS..	
.....	62
5.2.1. <i>Produção de IL-12 recombinante canina em larvas de Heliothis virescens</i>	62
5.2.1.1.Infecção e coleta de hemolinfa de larvas de <i>H. virescens</i>	62
5.2.1.2.Purificação de IL-12 recombinante canina de hemolinfa de larvas de <i>H. virescens</i>	63
5.2.1.2.1.Cromatografia de afinidade.....	63
5.2.1.2.2.Cromatografia de troca iônica	64
5.2.2. <i>Produção de IL-12 recombinante canina em células de inseto (BTI-Tn-5B1-4)</i>	67
5.2.2.1.Avaliação da expressão por SDS-Page	67
5.2.2.2.Identificação de IL-12 por Western Blot	70
6.DISSCUSSÃO	73
7.CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

A interleucina 12 (IL-12) é uma citocina de importante no desenvolvimento da resposta imune do tipo celular, sendo produzida principalmente por células apresentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos, monócitos e linfócitos B) e neutrófilos (WATFORD ET AL., 2003), mediante estímulos gerados por bactérias, parasitos intracelulares e fungos (TRINCHIERI, 2003). Esta citocina exibe várias atividades funcionais, incluindo a capacidade de promover a diferenciação de células T CD4+ inexperientes para células do tipo T_H1 (HSIEH ET AL., 1993). Vários autores sugerem que IL-12 pode favorecer o desenvolvimento de resposta imune do tipo T_H1 quando co-administrada com antígenos em animais (AFONSO ET AL., 1994; DE JONG ET AL., 1997; SALDARRIAGA ET AL., 2006; TEWARY ET AL., 2006)

Em linfócitos T e células NK, a IL-12 induz a produção de interferon- γ (IFN- γ), o qual promove a atividade microbicida e a expressão de moléculas do MHC classe I e II em células fagocíticas durante a resposta imune inata. IFN- γ também promove a diferenciação e expansão de populações de linfócitos T_H1 CD4⁺ e CD8⁺ (WATFORD ET AL., 2003).

Por outro lado, a produção de IL-12 pode ser é inibida através do bloqueio da transcrição dos genes p35 e p40 pelo IL-10 (ASTE-AMEZAGA ET AL., 1998; D'ANDREA ET AL., 1993), e da desestabilização da molécula de RNAm de p40 pelo TGF- β (DU & SRIRAM, 1998).

A identificação de IL-12 como elemento importante no desenvolvimento de resposta imune celular do tipo T_H1 , especialmente em enfermidades onde o estabelecimento de resposta T_H2 é prejudicial ao indivíduo, levou ao uso desta citocina como agente imunomodulador da resposta imune e como adjuvante em formulações candidatas a vacina (AFONSO ET AL., 1994; HEINZEL ET AL., 1993; HELLER ET AL., 2001; LUCAS & HELLER, 2001; SALDARRIAGA ET AL., 2006; STOBIE ET AL., 2000; YAMAKAMI ET AL., 2001).

O uso da IL-12 deve ser realizado com cuidado uma vez que a administração de doses altas ou repetitiva pode ocasionar efeitos tóxicos (GATELY ET AL., 1994; NASTALA ET AL., 1994), em especial, em decorrência da produção de IFN- γ (ATKINS ET AL., 1997; LEONARD ET AL., 1997). Uma das estratégias para evitar efeitos colaterais indesejados, seria o uso de pequenas quantidades de IL-12 em associação com outras citocinas que apresentam atividades sinérgicas. Como a IL-12 foi descrita inicialmente como um fator estimulante de linfócitos T e células NK que possuía sinergia com a interleucina-2 (IL-2) (KOBAYASHI ET AL., 1989; STERN ET AL., 1990) muitos autores utilizam esta combinação para desenvolvimento de métodos imunoterapêuticos e/ou vacinas.

A IL-2 é secretada principalmente por linfócitos T_H1 e T_c1 (Mosmann, T. R. and S. Sad (1996). "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." *Immunol Today* 17(3): 138-46) e participa como fator indutor de proliferação de linfócitos T ativados (GILLIS ET AL., 1978a); (ROBB ET AL., 1981).

A administração de IL-2 administrada em animais leva a proliferação uma população de células com características de linfócitos citotóxicos principalmente no fígado, baço, rins, linfonodos e cérebro (ORTALDO ET AL., 2005; ROSENBERG ET

AL., 1987). Além disso, logo após a administração de IL-2, observa-se aumento transitório da concentração sérica de IFN- γ secretado por células NK (ORTALDO ET AL., 2005).

Visando a avaliação do potencial de IL-12 e/ou IL-2 no desenvolvimento de vacina ou método imunoterápico contra a leishmaniose visceral canina, infecção contra a qual a resposta imune protetora é do tipo celular (PINELLI ET AL., 1994a; PINELLI ET AL., 1995; PINELLI ET AL., 1994b; RHALEM ET AL., 1999), em nosso laboratório, foram clonados os cDNAs dessas duas citocinas caninas. Foi elaborada uma construção plasmideal capaz de expressar IL-12 canina (pcDNA3.1-scca-IL-12), como uma proteína de cadeia única (DOS SANTOS ET AL., 2004), e outra construção capaz de expressar IL-2 (pcDNA3.1-ca-IL-2) em células de mamífero. No presente trabalho, grupos de cães saudáveis foram injetados com plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 e/ou pcDNA3.1-ca-IL-2 por via muscular por eletroporação. Em seguida, os cães foram submetidos à avaliação clínica, clínico-laboratorial (hemograma, determinação da concentração de transaminases, proteínas, ureia e creatinina no soro) e ensaios foram realizados para a detecção da expressão das proteínas recombinantes (sensibilização de CMNSP para produção de IFN- γ e determinação da concentração de IL-2 no soro). Não foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados entre os grupos de animais. Devido ao insucesso na indução de efeitos biológicos consequentes a administração de plasmídeo codificantes das citocinas, experimentos foram realizados para produzir IL-12 para a administração em cães.

Visando a produção de IL-12, duas construções diferentes com cDNA de IL-12 canina em baculovírus, sendo uma produzida previamente em nosso laboratório e

outra no presente trabalho, foram usadas para infectar células de linhagem de inseto (células de *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INTERLEUCINA-12

Dois grupos de pesquisadores descobriram, independentemente um do outro, um fator com características biológicas e estruturais únicas (KOBAYASHI ET AL., 1989; STERN ET AL., 1990), que mais tarde foi denominado interleucina-12 (IL-12). Pesquisadores de um dos grupos descreveram a identificação de uma citocina, inicialmente denominada de fator estimulatório de células NK (NKSF), com 70 kDa, capaz de promover a produção de IFN- γ , isoladamente ou em sinergia com IL-2, o aumento da citotoxicidade de células NK e a proliferação de células estimuladas por mitógenos, a partir de linfócitos de sangue periférico (KOBAYASHI ET AL., 1989). Pesquisadores do outro grupo descreveram a identificação de uma citocina, inicialmente denominada de fator de maturação dos linfócitos citotóxicos (CLMF), com 75 kDa, capaz de promover a proliferação de linfoblastos gerados pela estimulação com um mitógeno e, em combinação com IL-2, a produção de células LAK (do inglês, *lymphokine-activated killer cells*, (STERN ET AL., 1990). Os grupos purificaram a IL-12 a partir de sobrenadante de cultura de células linfoblastóides humanas transformadas por vírus Epstein-Barr estimuladas com forbol di-éster (KOBAYASHI ET AL., 1989) ou forbol éster e ionóforo de cálcio (STERN ET AL., 1990) por cromatografia de troca iônica, gel filtração e fase reversa.

Uma vez que CLMF e NKSF foram caracterizados e o cDNA correspondente clonado (GUBLER ET AL., 1991) tornou-se claro que as atividades biológicas eram associadas a uma única citocina, que foi denominada de Interleucina-12 (IL-12). Estruturalmente, a IL-12 é uma glicoproteína composta por duas subunidades com 40 kDa (denominada p40) e 35 kDa (denominada p35), ligadas entre si por uma ponte de dissulfeto (KOBAYASHI ET AL., 1989; STERN ET AL., 1990) que são codificadas em seres humanos por genes localizados nos cromossomos 5 ou 3, respectivamente. As cadeia polipeptídicas madura das subunidade p40 e p35 possuem 306 aminoácidos (AA) 197 AA, respectivamente, e ambas exibem sítios potenciais de N-glicosilação (GUBLER ET AL., 1991). Nenhuma das duas subunidades testadas isoladamente ou em mistura após purificação de cada cadeia isolada exibe atividade biológica sugerindo que a estrutura heterodimérica da proteína nativa é necessária para a função da IL-12 (CHIZZONITE ET AL., 1991; GUBLER ET AL., 1991; PODLASKI ET AL., 1992; WOLF ET AL., 1991).

O cDNA de IL-12 de diversos mamíferos, incluindo a do camundongo, do gato e do cão domésticos, e do boi, já foi clonado e a proteína expressa a partir do cDNA (OKANO ET AL., 1997; SCHOENHAUT ET AL., 1992) apresenta atividades biológicas semelhantes a da citocina humana.

A administração de IL-12 foi avaliada no tratamento de tumores em camundongos, como por exemplo, o melanoma ou o adenocarcinoma renal. Nessas circunstâncias, IL-12 era induz o aumento da atividade de células NK e de linfócitos T citotóxicos, além da produção de IFN- γ linfocitária, e promove redução do tamanho de nódulos tumorais e do número de metástases (BRUNDA ET AL., 1993). Durante a avaliação de IL-12 como um agente antineoplásico em seres humanos, doses

diárias da citocina foram utilizadas e efeitos tóxicos sistêmicos, incluindo febre/calafrios, fadiga, náuseas, vômito e cefaléia, além de anemia, trombocitopenia, neutropenia, linfopenia, hiperglicemia e hipoalbuminemia foram observados, provavelmente, em consequência à produção de IFN- γ (ATKINS ET AL., 1997). Em um estudo foi mostrado que a administração de IL-12 duas semanas antes do uso de doses diárias reduz a toxicidade, uma vez que impede uma grande produção IFN- γ (LEONARD ET AL., 1997).

2.2. INTERLEUCINA-2 (IL-2)

Logo após a descoberta de que lectinas de plantas estimulavam a proliferação de linfócitos T humanos, alguns fatores mitogênicos foram encontrados nos sobrenadantes destas culturas (GORDON & MACLEAN, 1965; KASAKURA & LOWENSTEIN, 1965).

Em 1976, em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), foi relatada a existência de um fator mitogênico capaz de promover a proliferação de linfócitos T humanos provenientes de medula óssea (MORGAN ET AL., 1976). Esta descoberta possibilitou a elaboração de um método para quantificar o fator mitogênico para células T (TCGF, (GILLIS ET AL., 1978b). Para isso, foi gerada uma linhagem de células de camundongos, que caracterizadas como linfócitos T CD8 e denominadas de CTLL-2. A obtenção dessas células, que são dependentes do fator mitogênico para a sobrevivência e multiplicação (GILLIS ET AL., 1978a), permitiu a purificação e

caracterização bioquímica do TCGF, mais tarde denominado IL-2 (GILLIS ET AL., 1980; WATSON ET AL., 1979).

Em 1980, um grupo de pesquisadores isolou pela primeira vez a IL-2 proveniente de sobrenadante de esplenócitos de camundongo ou rato estimulados por 48 horas com concanavalina A (Con A) através de cromatografia e separação por ponto isoelétrico (SMITH ET AL., 1980). Mais tarde, o cDNA de IL-2, obtido a partir de células da linhagem Jurkat estimuladas Con A, foi clonado plasmídeo e células COS-7 transfectadas foram usadas para a produção de IL-2 recombinante (TANIGUCHI ET AL., 1983).

A administração de IL-2 em camundongos (ETTINGHAUSEN ET AL., 1985) e posteriormente em seres humanos (ATKINS ET AL., 1986) promove proliferação celular em órgãos linfóides e aumento da actividade citotóxica.

2.3. SINERGIA ENTRE IL-12 E IL-2

O fato de IL-12 e IL-2 exibirem sinergismo na indução da produção de IFN- γ e citotoxicidade por células NK e linfócitos T citotóxicos gerou o interesse na avaliação da combinação dessas duas citocinas no tratamento de neoplasias modulação da resposta imune contra patógenos intracelulares (CHAN ET AL., 1991; KOBAYASHI ET AL., 1989; STERN ET AL., 1990).

Inicialmente, o efeito sinérgico entre IL-12 e IL-2 na produção IFN- γ de foi atribuído a mecanismos pós-transcricionais que promovem estabilidade do RNAm de IFN- γ e aumenta sua meia-vida (CHAN ET AL., 1992). Mais tarde, o aumento na

estabilidade do RNAm foi atribuído também a ativação da proteína cinase C citoplasmática (YE ET AL., 1995).

O aumento da atividade citotóxica mediado pela combinação de IL-12 e IL-2 está relacionado a uma maior expressão de granzimas e perforinas (DEBLAKER-HOHE ET AL., 1995).

O sinérgimo IL-12 e IL-2 permite a utilização de doses sub-ótimas de cada uma dessas duas citocinas, dessa maneira reduzindo o risco de efeitos tóxicos(KAUFMAN ET AL., 2002).

Um efeito sinérgico e benéfico da associação de IL-12 e IL-2 sobre a resposta imune foi descrito na hanseníase. A susceptibilidade a essa infecção esta relacionada à incapacidade de CMNSP apresentarem uma resposta proliferativa *in vitro* após a estimulação com antígenos de *Mycobacterium leprae*. Interessantemente, CMNSP de pacientes com hanseníase estimuladas com antígenos de *Mycobacterium leprae* IL-12 e IL-2 apresentam proliferação e produção de IFN- γ específica (DE JONG ET AL., 1997). Esses dados sugerem que IL-12 e IL-2 podem favorecer respostas imunes T_H1 úteis no desenvolvimento de métodos imunoterápicos.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL:

Produzir reagentes com potencial de promover imunomodulação em cães.

3.2. ESPECÍFICOS:

- Determinar se a administração de plasmídeo codificando de IL-12 e/ou IL-2 induz alterações tóxicas e biológicas em cães
- Avaliar a expressão de IL-12 recombinante canina em células de inseto por baculovírus

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEO CODIFICANTE DE IL-12 E IL-2 CANINAS

Escherichia coli da linhagem TOP 10 F' (Invitrogen, Carlsbad, EUA) transformada com plasmídeo pcDNA3.1 sem inserto (Invitrogen), com cDNA de IL-12 canina na forma de proteína de fusão de cadeia única (pcDNA3.1-scca-IL-12, (DOS SANTOS ET AL., 2004) ou com cDNA de IL-2 canina, pcDNA3.1-caIL-2 (PEREIRA, 2006), foi cultivada em meio de cultura Luria Bertani (LB) ágar (triptona a 1%, m/v, HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia, extrato de fungo 0,5%, m/v, VETEC Química, Duque de Caxias, Brasil, NaCl a 1 %, m/v e ágar a 1,5%, m/v) contendo ampicilina a 100 µg/mL por 16 horas, a 37 °C. Colônias isoladas de TOP 10 F'-pcDNA3.1 sem inserto, TOP10F'-pcDNA3.1-scca-IL-12 ou TOP 10 F'-pcDNA3.1-caIL-2, foram utilizadas. Cada colônia foi utilizada usada para inocular 5 mL de caldo em caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina em tubo de 25 mL. Os tubos foram incubados por 8 horas, a 37 °C, a 250 rpm em uma incubadora orbital (Lab-Line, Seattle, EUA). Após este período, 5 mL de suspensão bacteriana foram usados para inocular 2,5 L de caldo LB com 100 µg/mL de ampicilina. Cada nova suspensão bacteriana foi incubada por 16 horas, a 37°C, a 250 rpm. Cada sedimento bacteriano foi obtido pela centrifugação a 6.000 x g, por 15 minutos, a 4°C. Alíquotas de sedimento foram armazenadas a -20 °C, até o momento do uso. Plasmídeo foi purificado por cromatografia de troca iônica usando-se reagentes do conjunto QIAGEN Plasmid Giga Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) e seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, cada sedimento proveniente de 7,5 L de cultura de bactéria foi ressuspensão em 375 mL de tampão P1 [50 mM Tris-Cl, pH

8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A], em seguida, 375 mL de tampão P2 [200 mM NaOH, 1% SDS (m/v)] foram acrescentados e a suspensão foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (TA) para que ocorresse a lise bacteriana e a precipitação de DNA. Um volume de 375 mL de tampão P3 [3 M de acetato de potássio, pH 5,5] foi acrescentado e a suspensão foi incubada por 15 minutos a 4°C, para neutralizar o pH. A suspensão resultante foi centrifugada a 6000 g, por 1 hora, a 4°C. Depois disso, o sobrenadante foi filtrado em tecido de algodão para eliminação dos restos celulares. Um volume correspondente a 10% do filtrado do tampão ER [750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 10% Triton X-100] foi acrescentado e, a mistura, foi incubada por 30 minutos, a 4°C, para remoção de endotoxinas. Em seguida, aplicou-se a mistura a uma coluna de troca iônica, previamente equilibrada com 75 mL de tampão QBT [750 mM NaCl; a 50 mM MOPS (ácido morfolínico-fenil-sulfônico), pH 7,0; 15% isopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100 (v/v)] e, com 600 mL de tampão QC [1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol (v/v)], lavou-se a coluna. Um volume de 100 mL de tampão QF [1,25 M NaCl; 50 mM Tris•Cl, pH 8,5; 15% isopropanol (v/v)] foi usado para eluir a coluna. Um volume de 52,5 ml de isopropanol foi acionado ao eluato e a mistura foi submetida à centrifugação a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4°C. O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70 % e, depois disso, tubos contendo DNA foram mantidos à TA, por 10 minutos, para evaporação de resíduos de etanol. O DNA plasmideal foi ressuspenso em 5 mL salina estéril [0,9% NaCl (v/v)], uma alíquota foi retirada para quantificação e avaliação por eletroforese em gel de agarose, e o resto foi armazenado a -20°C, até o momento do uso.

4.1.1. Quantificação e avaliação dos plasmídeos de IL-12 e IL-2 recombinantes caninas

A concentração de cada alíquota de plasmídeo foi realizada por espectrometria (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, EUA). Foram realizadas leituras ópticas a 260 (para a detecção DNA), 280 (para detecção de proteínas e fenóis) e 230 nm (para detecção de sais como EDTA, carboidratos e alguns fenóis).

Para avaliar a integridade e o grau de pureza das preparações plasmídeais, amostras dos plasmídeos foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio (Figura 1) seguindo protocolos já descritos anteriormente na literatura (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

4.1.2. Mensuração da concentração de endotoxinas

A concentração de endotoxinas foi determinada pelo teste cromogênico de lisado de amebócitos do *Limulus* (LAL), usando-se reagentes do conjunto QCL-1000 (Lonza, Walkersville, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, uma curva de calibração foi elaborada usando-se misturas de: a) 50 µL de H₂O com diferentes quantidades de LPS, b) 50 µL do LAL, que contém uma proenzima susceptível a ativação por LPS e c) 100 µL de uma solução de substrato sintético (que possui p-nitroanilina ligada a um oligopeptídeo) para a enzima ativada por LPS. Quando a enzima age sobre o substrato ocorre liberação de p-nitroanilina que exibe uma cor amarela e absorção óptica entre 405-410 nm. Volume de 50 µL de cada amostra diluída foi avaliada em duplicata substituindo-se a amostra por LPS diluído. Dez minutos depois 100 µL/reação de ácido acético glacial

a 25 % (v/v) foram usados para bloquear a atividade enzimática e, depois, foi realizada a leitura óptica a 405 nm em um leitor de ELISA (Emax Precision Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, EUA) e a análise dos resultados foi feita usando-se o programa Softmax 3.0. Os valores de LPS foram expressos em EU/mL, após multiplicação pelos fatores de diluição apropriados.

4.2. ANIMAIS

Quinze cães saudáveis, sem raça definida, com idade estimada de dois a quatro anos, sendo dez machos e cinco fêmeas, de porte de médio a grande (média de 17 kg) foram usados. Os animais foram mantidos no canil experimental do CPqGM/FIOCRUZ, conforme as Boas Práticas de Experimentação Animal preconizadas para a espécie (OLFERT ET AL., 1993) e de acordo com as normas de experimentação animal da Fundação Oswaldo Cruz (Licença CEUA nº.24/2009-1). Os animais foram tratados com anti-helmínticos e vacinados contra cinomose, hepatite contagiosa, adenovirose, parvovirose, parainfluenza, leptospira (*canícola* + *icterohaemorrhagiae*) e raiva (Canigen, Virbac, Jurubatuba, Brasil).

4.2.1. Administração de plasmídeo por eletroporação

Os cães foram divididos em grupos de três animais cada. Os grupos de animais foram injetados 3 vezes, com intervalo de 2 dias entre cada duas injeções consecutivas (Figura 1), com: a) salina (controle negativo 1), b) 1 mg de plasmídeo pcDNA3.1-vazio (controle negativo 2), c) mistura de 500 µg de pcDNA3.1-ca-IL-2 e

500 µg de pcDNA3.1-vazio, d) mistura de 500 µg de pcDNA3.1-calL-12 e 500 µg de pcDNA3.1-vazio, e e) mistura de 500 µg de pcDNA3.1-calL-12 e 500 µg de pcDNA3.1-calL-2.

Para a realização das injeções, cada cão foi anestesiado pela administração de Acepromazina 0,1 mL/Kg (Acepran, Avipec, Fortaleza Brasil), por via subcutânea na região dorsal, seguida de Tiletamina e Zolazepan 0,12 mL/Kg (Zoletil, Virbac) por via venosa. Posteriormente, 10 eletrodos, distribuídos em duas filas paralelas de 5 eletrodos, foram introduzidos no quadrante superior externo do músculo extensor de um dos membros posteriores, numa profundidade de cerca de 2,5 cm. Depois disso, foi realizada a injeção de salina ou plasmídeo em um volume de 1 mL, usando-se uma agulha descartável de 22G (30 x 0,7 mm) (BD Biosciences, San Jose, EUA) e foram aplicados 8 pulsos elétricos, com duração de 20 ms/pulso, com do campo elétrico de força 200 V/cm e frequência de 1 Hz (PAVLIN ET AL., 2008), utilizando-se um eletroporador construído pelo Dr. Yuri Pepe, Departamento de Física da Universidade Federal da Bahia.

4.2.2. Parâmetros avaliados

4.2.2.1. Avaliação clínica

Os animais foram submetidos no dia -2 e diariamente entre o dia 1 e 16, com relação à primeira injeção de plasmídeo (Figura 1), a exame clínico, realizado por uma médica veterinária (Dra Fabienne Petitinga de Paiva), que consistiu na observação do comportamento e exame físico, incluindo a avaliação de temperatura

corporal, pele, mucosas, linfonodos e baço. Além disso, o peso corporal dos animais foi avaliado no dias 1, 5 e 16 .

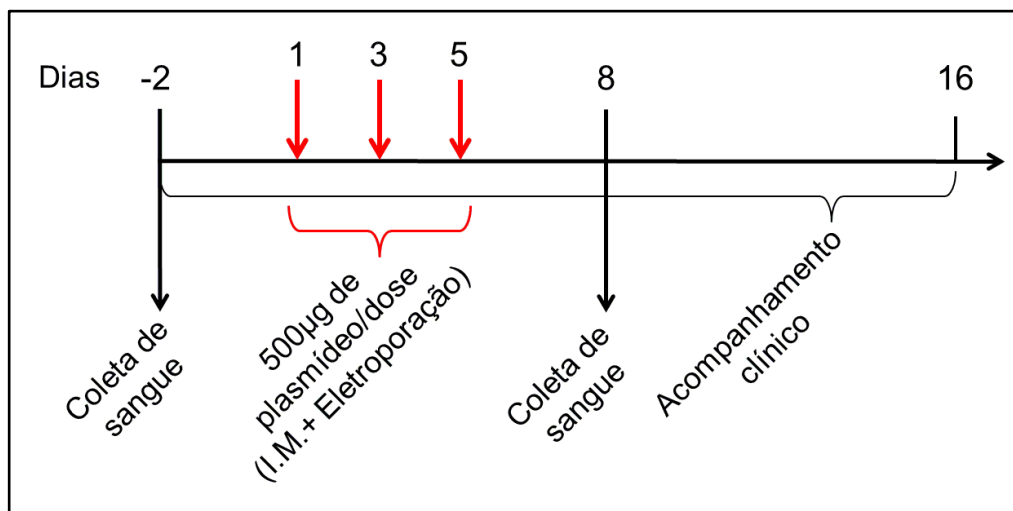


Figura 1 – Cronograma do experimento com cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes caninas.

4.2.2.2. Avaliação clínico-laboratorial

Para realização dos exames clínico-laboratoriais, um volume de cerca de 6 mL de sangue periférico foi coletado pela veia cefálica, nos dias -3 e 8 de cada cão (Figura 1). As amostras de sangue foram coletadas usando-se seringas e agulhas descartáveis. Em seguida, uma alíquota de sangue coletado foi transferida para um tubo de vidro contendo anticoagulante (EDTA) e outra alíquota foi transferida para um tubo de vidro sem anticoagulante.

As amostras de sangue com anticoagulante foram avaliadas em um laboratório veterinário (Citivet, Salvador, Brasil) quanto a hematócrito, volume corpuscular médio de eritrócitos (VCM), concentração de hemoglobina por 100 mL e

média de concentração de hemoglobina por eritrócito (HCM), concentração absoluta de leucócitos por μL (mm^3) e relativa de cada subgrupo de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos), concentração e dimensões de plaquetas. Em amostras de sangue sem anticoagulante foram utilizadas para a obtenção de soro. Amostras de soros foram usadas para a determinação da concentração de proteínas totais e frações (albumina e globulinas), transaminases (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase), uréia e creatinina.

4.2.2.3. Avaliação da expressão de IL-12 e/ou IL-2

A expressão de IL-12 e/ou IL-2 foi avaliada nos cães no dia 8 (3 dias após a aplicação da terceira dose de plasmídeo).

4.2.2.3.1. Avaliação da expressão de IL-12 nos cães

Previamente, Saldarriaga e colaboradores (SALDARRIAGA ET AL., 2006) mostraram que a administração de IL-12 *in vivo*, ou melhor, plasmídeo codificando IL-12 canina, promove a sensibilização de CMNSP levando essas células responderem a estímulos *in vitro*, como por Con A e IL-12, produzindo mRNA e IFN- γ . Por isso, foi avaliada a capacidade de IL-12 e/ou IL-2 de sensibilizar CMNSP nos animais do nosso experimento. Para isso, uma amostra de 30 mL de sangue de cada cão foi coletada pela veia jugular usando-se escalpe e uma seringa 500 UI de heparina sódica (Eurofarma, Ribeirão Preto, Brasil). Cada amostra de sangue foi diluída de 1:2 em solução salina balanceada de Hank (HBSS; Sigma-Aldrich, St.

Louis, EUA) tamponada com 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico), pH 7,0 (HEPES; Invitrogen). Em tubos de polipropileno de 50 mL, dois volumes de sangue diluído foram depositados sobre um volume de Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Inglaterra). Após centrifugação por 35 minutos, a 800 x g e a 25°C, as CMNSP foram transferidas para outro tubo. As células foram lavadas duas vezes usando-se HBSS tamponada e centrifugação por 15 min, a 600 x g e a 4°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial (RPMI 1640, Sigma-Aldrich) suplementado 10 mM de HEPES (pH 7,0), 10% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 10 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de gentamicina (Nova Farma Ltda., Brasil), denominado meio RPMI completo. A concentração e a viabilidade celular foi determinada pela suspensão das células em azul de Trypan e contagem em uma câmara de Neubauer. As CMNSP foram ajustadas para a concentração de 2×10^6 células/mL usando-se RPMI completo e volumes 100 µL de foram colocados em poços de uma placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato. Em quaduplicata de poços, foram acrescentados 100 µL de RPMI completo (G1) ou 100 µL sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1 vazio diluído de 1:20 (G2), sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-scca-IL-12 diluído de 1:200 (G3), sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-calL-2 diluído de 1:20 (G4), sobrenadante de COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-scca-IL-12 diluído de 1:200 em associação com sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-ca-IL-2 diluído de 1:20 (G5), Con A a 1 µg/mL (G6) ou a 10 µg/mL (G7); Con-A a 1 µg/mL em associação com sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-scca-IL-12 diluído de 1:200 (G8). Os sobrenadantes de células COS transfectadas,

produzidos previamente em nosso Laboratório e armazenado a -20 C até o momento do uso, mostraram atividade de IL-12 e IL-2, no que tange a indução expressão de IFN- γ por CMNSP de cão, nas diluições mencionadas acima (PEREIRA, 2006). As placas foram incubadas a por 48 h, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, em uma atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2 . Os sobrenadantes de cada quaduplicata foram transferidos para um microtubo. Os microtubos foram centrifugados a $2.000 \times g$ por 10 min e os sobrenadantes resultantes foram aliquotados e armazenados a -20°C até o momento do uso.

A mensuração da concentração de IFN- γ nos sobrenadantes de CMNSP foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura usando-se reagentes da R&D Systems (R&D Systems, cidade, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços de alta afinidade (*High Binding*; Corning Incorporated, cidade, país) foram sensibilizadas com 100 μL /poço de anticorpo de captura na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os poços foram bloqueados com 300 μL /poço de tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA), 5% de sacarose e 0,05% p/v de azida sódica. Para a elaboração da curva de calibração, diluições duplas e seriadas de IFN- γ canino recombinante variando de 62,5 pg/mL a 16 ng/mL foram usadas em duplicatas de poços em um volume de 100 μL /poço. As amostras de sobrenadante de cultura foram testadas em duplicatas com 100 μL /poço. Foi colocado um volume de 100 μL /poço de anticorpo de detecção numa concentração de 100 ng/mL e, em seguida, um volume de 100 μL /poço de estreptavidinaperoxidase diluída de 1:200. A reação foi revelada pela adição de 100 μL /poço do substrato tetrametilbenzidina (TMB; Sigma-Aldrich) por 30 minutos e neutralizada com 50 μL de H_2SO_4 a 1 M. A leitura da óptica (DO) foi realizada a 450 nm usando-se um leitor de ELISA (Emax Precision

Microplate Reader). A concentração de IFN- γ canino presente em cada amostra foi estimada pela comparação dos valores de D.O. das duplicatas de cada amostra com os da curva padrão de IFN- γ canino recombinante, usando o programa Softmax 3.0, corrigidas pelo fator de diluição, quando necessário, e expressas em pg/mL.

4.2.2.3.2. Avaliação da expressão de IL-2

Para avaliação de IL-2 uma amostra de sangue de 5 mL de cada cão foi coletada pela veia jugular no dia 8. Cada amostra de sangue foi transferida para um tubo de 15 mL de polipropileno. Os tubos foram incubados por cerca de uma hora a temperatura ambiente. Após a retração de coágulo, sobrenadante foi transferido para um novo tubo, que foi centrifugado a por 10 minutos a 1500 x g, a temperatura ambiente. Alíquotas de soro foram armazenadas a -20°C , até o momento do uso.

Para a avaliação da concentração de IL-2, amostras de soro de cada cão foi usada em uma ensaio biológico, usando-se células da linhagem CTLL-2 (TIB-214, ATCC, Manassas, EUA), previamente descrito por GILLIS e colaboradores, 1978 (Gillis ET AL., 1978). CTLL-2 são células T citotóxicas originalmente obtidas de camundongos C57/BL6 que dependem de IL-2 para sobrevivência e proliferação. Resumidamente, células CTLL-2 em fase exponencial de proliferação foram lavadas com HBSS tamponada. Um volume de 100 μL contendo 1×10^4 células, ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado (com 2 mM de piruvato de sódio, 2 mM de L-glutamina e 10% de soro bovino fetal) foi colocado em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato. A triplicatas de poços foram acrescentadas 100 μL /poço de RPMI 1640 suplementado (controle negativo) ou, em

RPMI 1640 suplementado, sobrenadante de esplenócitos de rato estimulados por Con A a 10 µg/mL (T-Stim, fonte de IL-2, controle positivo) diluído de 1:16, sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-ca-IL-2 (PEREIRA, 2006) diluído de 1:16 (controle positivo), soro de cão diluído de 1:2. A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C, em uma atmosfera úmida com CO₂ a 5 %. Depois disso, a cada poço, foram acrescentados 30 µL de RPMI 1640 suplementado contendo 1 µCi de timidina[³H] (atividade específica 2 Ci/mmol – GE Healthcare Life Science). A placa foi incubada 24 h a 37 °C, em uma atmosfera úmida com CO₂ a 5 % e, depois disso, as células foram coletadas um filtro de fibra de vidro (Packard, Meriden, EUA) e partículas betas emitidas durante o período de um minuto (cpm), provenientes de células de cada poço isoladamente, foram contadas em aparelho Matrix 9600 Direct Beta Counter (Packard).

4.3. EXPRESSÃO DE IL-12 POR CÉLULAS DE INSETO INFECTADAS DE POR BACULOVÍRUS RECOMBINANTE

Para a produção de IL-12 canina recombinante foram utilizadas larvas de uma mariposa (*Heliothis virescens*) ou células de linhagem de outra mariposa (*Trichoplusia ni*, células BTI-Tn-5B1-4) infectadas por baculovírus (*Autographa californica* “nuclear multiple polyhedrosis vírus” – AcMNPV) contendo cDNA codificando IL-12 na forma de proteína de fusão de cadeia única (scca-IL-12).

4.3.1. Construções elaboradas em baculovírus

Em nosso Laboratório, previamente, foi elaborada uma construção em na qual cDNA de scca-IL-12 foi inserido no DNA genômico do baculovírus AcMNPV, usando-se o método descrito por Luckow e colaboradores, 1993 (LUCKOW ET AL., 1993). A construção elaborada (Baculovírus-scca-IL-12H, Figura 2C) possui nucleotídeos (na orientação 5'-3') que codificam: a) a subunidade p40 (incluindo a sequência líder), b) um espaçador com a sequência de aminoácidos (AA) GGGGGGS (DOS SANTOS ET AL., 2004), c) a cadeia polipeptídica subunidade p35 madura e d) uma sequência de 6 histidinas (OLIVEIRA ET AL., dados não publicados). Além disso, foi elaborada uma construção, para uso como controle negativo (Baculovírus-pFastBac1, Figura 2A), na qual foi inserido no DNA genômico do baculovírus AcMNPV o segmento de DNA do plasmídeo pFastBac1 (Invitrogen) entre as sequências Tn7L e Tn7R (alvos do transposon Tn7).

No presente trabalho, duas construções novas em baculovírus foram elaboradas. Essas construções foram concebidas para: a) expressar proteína verde fluorescente melhorada (EGFP, Baculovírus-SLgp67-EGFP-EH, Figura 2B, a ser usada como controle positivo, com o objetivo de favorecer a análise dos experimentos) e b) expressar maior quantidade de IL-12 canina na forma secretada (SLgp67-mp40E23mp35-E23H, denominada SLgp67-scca-IL-12EH, Figura 2D), usando-se sistema célula de inseto/baculovírus. A construção Baculovírus-SLgp67-EGFP-EH foi concebida com a sequência de nucleotídeos que codificam: a) sequência líder de uma glicoproteína de AcMNPV (gp67, para favorecer a secreção (WHITFORD ET AL., 1989), b) EGFP, d) um espaçador com 23 AA, e e) 6 histidinas. A construção Baculovírus-gp67-SLgp67-scca-IL-12EH foi concebida com a

sequência de nucleotídeos que codificam: a) sequência líder de gp67, b) cadeia polipeptídica a subunidade p40 madura, b) um espaçador com a sequência de aminoácidos (AA) GGGGSGGGGSGGGGS (LIESCHKE ET AL., 1997), c) a cadeia polipeptídica subunidade p35 madura e d) um espaçador com 23 AA, e e) 6 histidinas. Nas extremidades de cada uma das construções foram colocados sítios susceptíveis a endonucleases de restrição. As sequências de nucleotídeos das duas construções foram otimizadas visando à expressão em células de *Trichoplusia ni* e *Heliothis virescens* pela Geneart GmbH (Geneart GmbH, Regensburg, Alemanha). A otimização consiste na mudança de códons para: a) melhor uso dos recursos de tRNA, b) redução ou eliminação de sequências doadoras e/ou aceptoras para processamento-“splicing”, c) prevenção da formação de sequências secundárias de mRNA prejudiciais ao processo de tradução. A Geneart GmbH sintetizou as construções e as clonou separadamente em plasmídeos. Em nosso Laboratório, foi realizada, separadamente, a transferência do inserto SLgp67-EGFP-EH e gp67-SLgp67-scca-IL-12EH para o plasmídeo pFastBac1, por um processo simples de digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição, purificação de inserto e plasmídeo pFastBac1 linearizado e ligação, usando-se T4 ligase, gerando-se as construções pFastBac1-SLgp67-EGFP-EH e pFastBac1-gp67-SLgp67-scca-IL-12EH. A transferência de cada um dos insertos das construções pFastBac1-SLgp67-EGFP-EH e pFastBac1-gp67-SLgp67-scca-IL-12EH foi realizada conforme recomendações da Invitrogen. Resumidamente, *E. coli* DH10bac competente foi transformada com pFastBac1-SLgp67-EGFP-EH e pFastBac1-gp67-SLgp67-scca-IL-12EH na presença de kanamicina, gentamicina, tetraciclina, isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal) e colônias brancas foram selecionadas considerando-se o processo de α -

complementarização (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Colônias de DH10Bac brancas foram usadas cultivo caldo LB em tubos de vidro. Amostras de suspensão bacteriana foram usadas para a extração de bacmídeo (Bac-SLgp67-EGFP-EH e Bac-SLgp67-scca-IL-12EH, DNA genômico de AcMNPV modificado). Alíquotas de bacmídeo foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores homólogos a segmentos de DNA da AcMNPV para determinar o tamanho dos insertos.

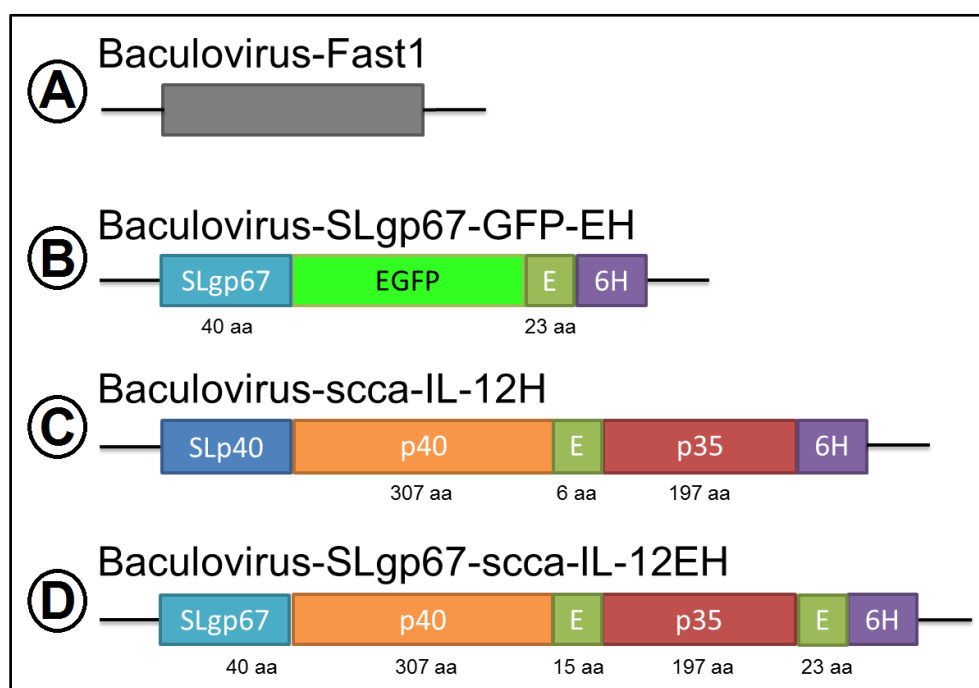


Figura 2 – Esquematização das sequências presentes nos diversos baculovírus utilizados. Foram utilizados quatro baculovírus, sendo: A) sem inserto (controle negativo); B) contendo a sequência codificante de EGFP (controle positivo); C) contendo a sequência codificante de IL-12 canina em cadeia única; D) contendo a sequência codificante de IL-12 canina em cadeia única otimizada, com a sequência líder da proteína de baculovírus gp67 e com um espaçador de 23 aminoácidos entre a sequência da proteína madura e a cauda de histidina.

Para geração de estoque viral, células BTI-Tn-5B1-4 foram transfectadas usando-se lipofectamina (Invitrogen), seguindo-se as recomendações do fabricante. Cada sobrenadante de células resultante de transfecção foi submetido titulação viral, usando-se o método da diluição limitante (O'REILLY ET AL., 1994). Depois disso, foi realizada a amplificação viral para geração de estoque viral de baculovírus-pFastBac1, baculovírus-SLgp67-EGFP-EH, baculovírus-scca-IL-12H, baculovírus-SLgp67- SLgp67-scca-IL-12EH (seguindo-se as recomendações da Invitrogen). Resumidamente, em cada um de 4 frascos 75 cm² foram colocadas 1×10^6 células BTI-Tn-5B1-4. Os frascos foram incubados por 24 h, a 27°C. Depois desse período, foi adicionado em cada um dos frascos um volume de sobrenadante resultante da transfecção de modo a se atingir a proporção entre 0,1 partícula viral por célula BTI-Tn-5B1-4 (multiplicidade de infecção-MOI: 0,1). Após 72 horas de incubação a 27°C, o sobrenadante de cada frasco (10,5 mL/frasco) foi, separadamente, coletado submetido a centrifugação por 5 minutos, a 250 x g, e a passagem por filtro de 0,22 µm e armazenado a 4°C protegido da luz até o momento do uso. Mais tarde, foi realizada a titulação viral de cada estoque (baculovírus-pFastBac1, baculovírus-SLgp67-EGFP-EH, baculovírus-scca-IL-12H, baculovírus- SLgp67-scca-IL-12EH), usando-se o método da diluição limitante.

Para a determinação da concentração de cada estoque viral, 100 µL de uma suspensão contendo $3,75 \times 10^3$ células BTI-Tn-5B1-4 foram colocados em cada poço de placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas por por 24 horas a 27°C. Volumes 10 µL de estoque viral diluído de 1×10^{-3} a 1×10^{-9} foram colocados em cada um de 12 poços. Volumes 10 µL do meio de cultura (TNM-FH, Sigma-Aldrich, com 10 % de SBF) foram colocados em uma fileira de 12 poços (controle negativo). As placas foram incubadas por 7 dias a 27°C e,

depois disso, realizada a leitura de infecção de células por baculovírus em cada poço. Na dependência da proporção de poços na última fileira na qual foi detectada a infecção e da diluição do estoque viral usado, foi determinado o título viral de cada estoque.

4.3.1.1. Infecção e coleta de hemolinfa de larvas de *H. virescens*

Para produção de IL-12 canina larvas de *H. virescens* e baculovírus-scca-IL-12H. O baculovírus-scca-IL-12H é capaz de infectar as larvas e, em princípio, promover a expressão da IL-12 canina recombinante secretada na hemolinfa dentro da hemocele.

Em nosso Laboratório, foram recebidas cerca de 100 larvas de *H. virescens*, as quais foram doadas gentilmente pelo Dr. José Roberto Postali Parra, Laboratório de Biologia de Insetos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. A partir dessas larvas, foram obtidos insetos adultos, ovos e novas larvas, essencialmente, conforme método descrito previamente (O'REILLY ET AL., 1994). Das novas larvas produzidas em nosso Laboratório, 390 foram injetadas com Baculovirus-scca-IL-12H e 50 com Baculovirus-pFastBac1 (controle negativo). Para a realizar a infecção, as larvas foram anestesiadas ao serem colocadas sob gelo picado por cerca de 15 minutos. Em seguida, usando-se uma seringa de 0,3 mL com uma agulha 8 x 0,3 mm, cada larva foi injetada com 10 µL contendo 5×10^4 partículas virais em uma das duas primeiras pseudo-patas (O'REILLY ET AL., 1994). Três dias após a injeção, as larvas foram anestesiadas sob gelo, banhadas em álcool 70% e secadas, usando-se gaze estéril. Com uma tesoura cirúrgica estéril, foi

removida uma das duas últimas pseudo-patas e, depois disso, foram injetados 300 μL de tampão de ligação [20 mM de Na_2HPO_4 , 15 mM de NaCl e 10 mM de imidazol, pH 7,4] contendo 5 mM de feniltiuréia (para impedir a melanização) em uma das primeiras pseudo-patas. A hemolinfa diluída passou a gotejar pela pseudo-pata removida e foi coletada em microtubos de 1,5 mL mantido sob gelo. A cada 4 larvas o microtubo usado era centrifugado por 5 minutos, a 460 x g e a 4° C. Depois da centrifugação, volumes de cerca de 15 mL e alíquotas de 50 μL de sobrenadante foram armazenados a -70°C até o momento do uso. Fazendo uma estimativa grosseira, foi assumido que o sobrenadante armazenado consistia de hemolinfa diluída de 1:10 desprovida de células, a partir de agora, denominada hemolinfa diluída. Os experimentos para a produção de hemolinfa foram realizados em colaboração com Marcelo Cunha Ribeiro e Dra. Fabienne Petitinga de Paiva.

4.3.1.2. Purificação de IL-12 por cromatografia a partir de hemolinfa de larvas de *H. virescens*

A purificação por cromatografia foi realizada usando-se um cromatógrafo ÄKTA Purifier 10 (GE Healthcare Life Science).

Para a realização da purificação por cromatografia de afinidade, uma coluna de sepharose-níquel (HisTrap HP 1 mL, GE Healthcare) foi usada, seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, a coluna foi equilibrada com 5 mL de tampão de ligação [20 mM de Na_2HPO_4 , 15 mM de NaCl e 10 mM de imidazol, pH 7,4]. Em seguida, uma amostra de 1 mL de hemolinfa diluída, passada por filtro de 0,22 μM , foi aplicada na coluna e, depois disso, a coluna foi lavada com 2 mL de

tampão de ligação. Finalmente, a coluna foi eluída com 7 mL do tampão de eluição [20 mM Na₂HPO₄; 500 mM de NaCl; 500 mM imidazol, pH 7.4]. Durante a eluição, frações de 1 mL foram coletadas e armazenadas a -20 °C, até o momento do uso.

Para a realização da purificação por cromatografia de troca iônica, uma coluna de baseada em trocas cargas (HiTrap Q Fast Flow 1 mL, GE Healthcare) foi usada, seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, a coluna foi equilibrada com 5 mL do tampão de ligação (50 mM de Tris e 25 mM de NaCl, com pH 6,5). O pH do tampão foi escolhido para ser intermediário entre o ponto isoelétrico (PI) da IL-12 recombinante (PI:6,8) e das principais proteínas da hemolinfa – proteínas de armazenamento, PI: 5,4 e 6,3; (SLOVAK & REPKA, 1993). Uma amostra de hemolinfa diluída foi submetida à diálise contra tampão de ligação com 5 mM de feniltiuréia, 3 banhos de um litro por dia, por 3 dias e, depois disso, foi passada por um filtro de 0,22 µm. Um volume de 1 mL da hemolinfa diluída dialisada e filtrada foi aplicada na coluna. A coluna foi eluída com um gradiente contínuo passado para 50 mM de Tris e 1 M de NaCl, pH 6,5; em 10 mL. Durante a eluição, frações de 1 mL foram coletadas e armazenadas a -20 °C, até o momento do uso.

As frações das cromatografias de afinidade e troca iônica foram submetidas à avaliação por SDS-PAGE, método já descrito anteriormente (LAEMMLI, 1970). Resumidamente, um sistema de gel de poli(acrilamida) com gradiente descontínuo foi utilizado. Dois géis foram elaborados. Cada gel contém superiormente gel para empilhamento elaborado com 5% e inferiormente o gel para separação elaborada com 12% de bis(acrilamida)/acrilamida, respectivamente, em tampão Tris. Amostras de marcadores de peso molecular ou de hemolinfas de larvas de *H. virescens* infectadas com baculovírus controle negativo ou codificante de scca-IL-12H

conforme descrição das figuras (para a cromatografia de afinidade) e (para cromatografia de troca iônica). Os géis foram corados com azul de Coomassie, (Sigma-Aldrich) e descorados com uma solução contendo metanol 30% e ácido acético glacial 7% (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

Os ensaios de purificação cromatográfica foram realizados em colaboração com Dr. Gustavo Fabian Saldaña.

4.3.2. Expressão de IL-12 em células BTI-Tn-5B1-4 infectas por baculovírus recombinante.

Para a expressão de IL-12 recombinante canina células BTI-Tn-5B1-4 foram infectadas com baculovírus-scca-IL-12H ou baculovírus- SLgp67-scca-IL-12EH. Como controle negativo e positivo, células BTI-Tn-5B1-4 foram infectadas com baculovírus-pFastBac1 e baculovírus-SLgp67-EGFP-EH, respectivamente. Resumidamente, em cada um de 4 frascos 25 cm² foram colocadas 3×10^5 células BTI-Tn-5B1-4. Os frascos foram incubados por 24 h, a 27°C. Depois desse período, foi adicionado em cada um dos frascos um volume de sobrenadante resultante da transfecção de modo a se atingir a proporção entre 10 partículas virais por célula BTI-Tn-5B1-4 (multiplicidade de infecção-MOI: 10). Após 72 horas de incubação a 27°C, o sobrenadante de cada frasco (3,5 mL/frasco) foi, separadamente, coletado submetido a centrifugação por 5 minutos, a 250 x g e armazenado a 4°C protegido da luz até o momento do uso. As células aderidas foram lisadas com tampão de amostra [100 mM de Tris Cl, pH 6,8; 4% de SDS (m/v); 0,2% de azul de bromofenol

(m/v); 20% de glicerol (v/v); 200 mM mercaptoetanol] e também armazenadas a 4°C protegido da luz até o momento do uso.

4.3.2.1. Avaliação da expressão por SDS-Page e identificação por Western Blot

Para a avaliação da produção da proteína SLgp67-scca-IL12EH em células de inseto, foram utilizados métodos previamente descritos: SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e Western blot (TOWBIN ET AL., 1979) modificado, usando-se o método de transferência úmido em aparelho de transferência eletroforética (“trans-blot”, Bio-rad, Califórnia, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, um sistema de gel de poliacrilamida com gradiente descontínuo foi utilizado. Dois géis foram elaborados. Cada gel contém superiormente gel para empilhamento elaborado com 5% e inferiormente o gel para separação elaborada com 12% de bisacrilamida/acrilamida, respectivamente, em tampão Tris. Amostras de marcadores de peso molecular ou de sobrenadantes e lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas conforme descrição da Figura 11. Um dos géis foi corado com azul de Coomassie, (Sigma-Aldrich) e descorados com uma solução contendo metanol 30% e ácido acético glacial 7% (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). O outro gel foi usado para a transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose de 45 µm (Bio-Rad), utilizando-se o tampão Tris a 24 mM, glicina a 192 mM e metanol a 20 %, p.H 8,3 e um aparelho de transferência eletroforética (Bio-Rad). A transferência foi por 1 h, usando-se 0,8 mAmp de corrente elétrica por cada cm² da membrana de nitrocelulose. Ao término, para a avaliação da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com corante vermelho Ponceau (vermelho Ponceau S a 0,1% (m/v) em ácido acético glacial a 5% (v/v)), por 5 minutos sob agitação

constante. Depois disso, a membrana foi lavada com H₂O destilada e pontos geográficos, como por exemplo, a linha de frente da corrida e as bandas correspondentes às moléculas indicadoras de peso molecular foram marcadas. Em seguida, a membrana foi bloqueada com tampão Tris a 24,8 mM, NaCl a 137 mM (TBS), leite desnatado a 5 % (m/v) e Tween 20 a 0,05 % (v/v), pH 8,0 (TBS-TL), durante a noite, a 4°C. Depois de lavar 3 vezes com TBS, 5 minutos cada vez, sob agitação constante, a membrana foi montada em um aparelho “Blotter” (Immunitics, modelo MN25, Boston, EUA). Esse aparelho divide a membrana de nitrocelulose em raias individuais com canaletas correspondentes, permitindo a revelação de proteínas em cada raia separadamente. Em cada canaleta foram colocados 350 µL de anticorpo monoclonal anti-histidina C-ter (Invitrogen R930) diluído a 1:1000 em TBS-TL. O “blotter” contendo a membrana foi incubado por 1h a temperatura ambiente, sob agitação suave com movimento em gangorra. As canaletas foram lavadas 3 vezes com TBS com Tween a 0,05 % (v/v, TBS-T). Depois disso, em cada canaleta foram colocados 350 µL de anticorpos anti-imunoglobulinas camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluídos a 1:500 em TBS-TL. O “blotter” contendo a membrana foi incubado novamente por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação suave com movimento em gangorra. As canaletas foram lavadas novamente 3 vezes com TBS-T. Em seguida, as canaletas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, a membrana foi transferida para um recipiente de plástico e lavada 2 vezes com TBS. Cada lavagem foi realizada em 5 minutos. Um volume de 15 mL de substrato de fosfatase alcalina foi colocado sobre a membrana, usando-se nitrozultetrazólio (NBT, Sigma-Aldrich) a 0,033 % (m/v) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, Sigma-Aldrich) a 0,0165 % (m/v) em tampão Tris a 0,1 M, NaCl a 100 mM e MgCl₂ a 5 mM, pH 9,5; seguindo-se as recomendações do fabricante. A

membrana foi incubada por 5 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação suave. Depois disso, a reação enzimática foi interrompida pela adição de H₂O destilada.

5. RESULTADOS

5.1. ADMINISTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS CODIFICANTES DE IL-12 E/OU IL-2 EM CÃES

5.1.1. Produção dos plasmídeos codificantes de IL-12 e IL-2 recombinantes caninas

Os plasmídeos foram purificados a partir de *E. coli* TOP10 transformadas com pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 ou pcDNA3.1 controle negativo através do método de lise alcalina e cromatografia de troca iônica (QIAGEN). Os plasmídeos pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 ou pcDNA3.1 controle negativo purificados e solubilizados em salina apresentaram a concentração de DNA e LPS: 2,301 µg/µL e 14,778 EU/mL; 2,302 µg/µL e 20,036 EU/mL; 2,237 µg/µL e 3,89 EU/mL, respectivamente (Tabela 1). Os resultados da proporção da leitura óptica a 260/280 e 260/230 nm mostraram-se aproximados a 1,8 e 2,2, sugerindo baixa concentração de contaminantes proteicos, fenóis e sais. Para avaliar a integridade e o grau de pureza das preparações plasmídeais, amostras dos plasmídeos foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio (Figura 3). O gel de agarose mostra nas raias correspondentes a aplicação de pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 ou pcDNA3.1 controle negativo duas bandas de DNA, uma compatível com moléculas únicas de plasmídeos super-espiralados (banda mais

baixa) e outra compatível com moléculas de concatâmeros de plasmídeos (banda mais alta).

5.1.2. Parâmetros avaliados

Foram realizadas avaliações clínicas diárias, exames clínico-laboratoriais comparando três dias antes da primeira administração e três dias após a terceira administração de plasmídeo e avaliação da expressão indireta de IL-12 (por dosagem de IFN- γ) e presença de IL-2 no soro (proliferação de células CTLL-2).

5.1.2.1. Avaliações clínicas

A temperatura corpórea, medida nos dias 1, 2, 3, 5, 7, 9 e 16 em relação à primeira administração de plasmídeos, se manteve estável em todos os grupos, variando entre 38,5 °C e 39,7 °C (Figura 4A). O peso dos animais, medidos nos dias 1, 5 e 16 em relação à primeira administração de plasmídeos, se manteve inalterado durante o experimento em todos os grupos, variando de 16,7 a 18,8 kg (Figura 4B). Aspectos clínicos como alterações na pelagem, nas mucosas oculares e bucal não foram observados durante o experimento, bem como tamanho dos órgãos linfoides (baço, linfonodos submandibulares e poplíteos) se mantiveram sem alterações.

Tabela 1 – Avaliação da qualidade dos plasmídeos pcDNA3.1 controle negativo, scca-IL-12 e ca-IL-2 utilizados para administração em cães

Plasmídeos	Total (mg)	260/280	260/230	Endotoxina	
				EU/dose	ng/dose
pcDNA3.1 controle negativo	67,107	1,89	2,27	1,945	1,080
pcDNA3.1 scca-IL-12	69,027	1,87	2,27	7,389	4,105
pcDNA3.1 ca-IL-2	69,075	1,89	2,28	10,018	5,565

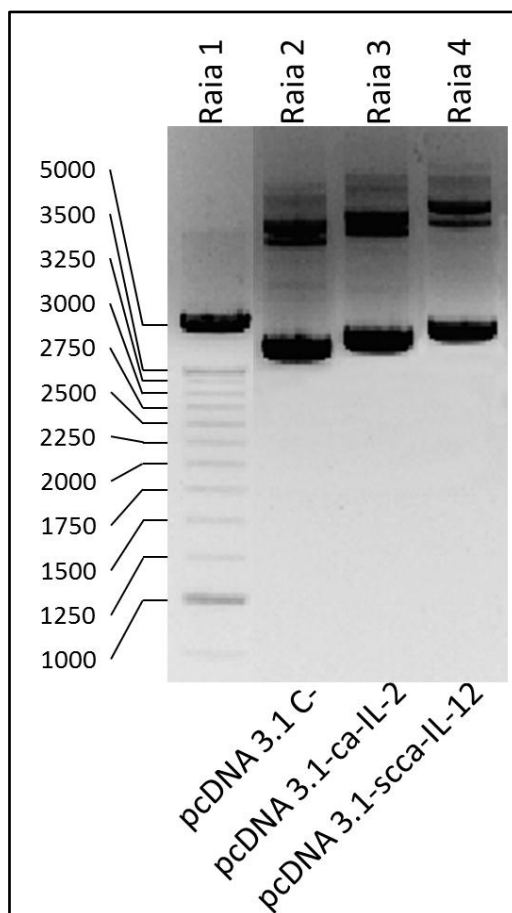


Figura 3 - Avaliação de plasmídeos por eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio para a avaliação da pureza e integridade dos plasmídeos. Raias: 1) marcadores de peso molecular; 2) 400 µg de pcDNA3.1 controle negativo; 3) 400 µg de pcDNA3.1-ca-IL-2; 4) 400 µg pcDNA 3.1-scca-IL-12.

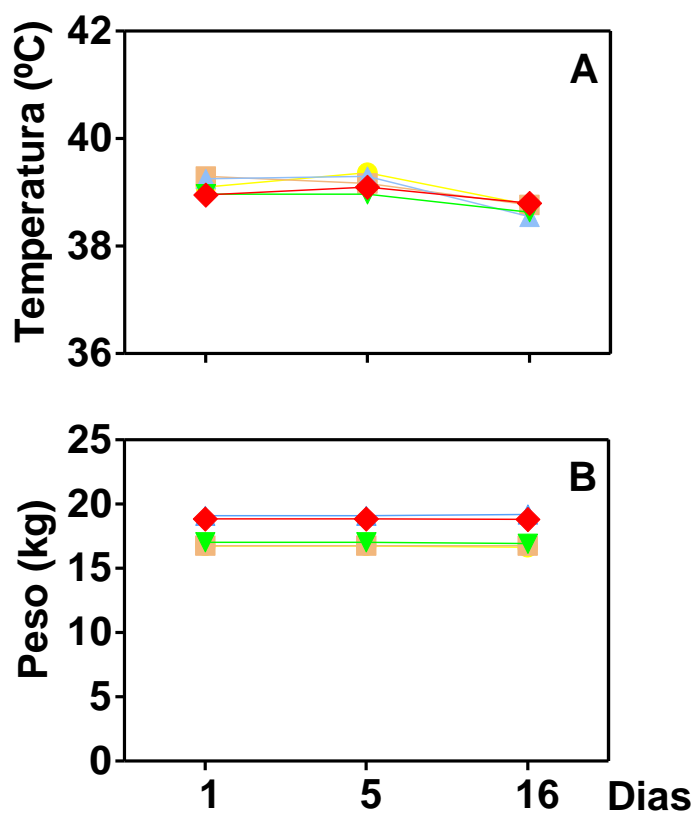


Figura 4 – Avaliações de temperatura (Figura 2A) e peso (Figura 2B) em cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes caninas. Grupos de 3 cães foram administrados 3 vezes por via intramuscular seguido de eletroporação, com intervalo de 2 dias entre as administrações, com: salina (●); pcDNA3.1 controle negativo (■); pcDNA3.1-scca-IL-12 (▲); pcDNA3.1-ca-IL-2 (▼); pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-ca-IL-2 (◆).

5.1.2.2. Avaliações clínico-laboratoriais

As avaliações clínico-laboratoriais foram realizadas em amostras de sangue coletadas três dias antes da primeira administração e três dias após a terceira administração para que fossem avaliados valores da série vermelha, série branca (incluindo suas subpopulações), série plaquetária, marcadores hepáticos e renais.

Dentre os parâmetros da série vermelha, na concentração de hemácias por mm^3 não foi encontrada qualquer alteração entre os grupos administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2, variando entre $7,4 \times 10^6 \pm 5,1 \times 10^5 \text{ cel/mm}^3$ para a coleta de amostras realizada três dias antes a primeira administração de plasmídeo e $7,1 \times 10^6$ e $4,7 \times 10^5 \text{ cel/mm}^3$ para a coleta de amostras realizada três dias após a terceira administração de plasmídeo, valores que se mantiveram dentro do limite de normalidade. Foi avaliado o nível de hemoglobina entre os cães administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2, porém não houve diferença entre os grupos (Figura 5).

Além das concentrações de hemácias por mm^3 e de hemoglobina no sangue, foram avaliados o volume corpuscular médio de hemácias e a concentração de hemoglobina corpuscular média, mas não foram encontrados valores diferentes entre os grupos administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2 e se mantendo dentro dos valores de normalidade.

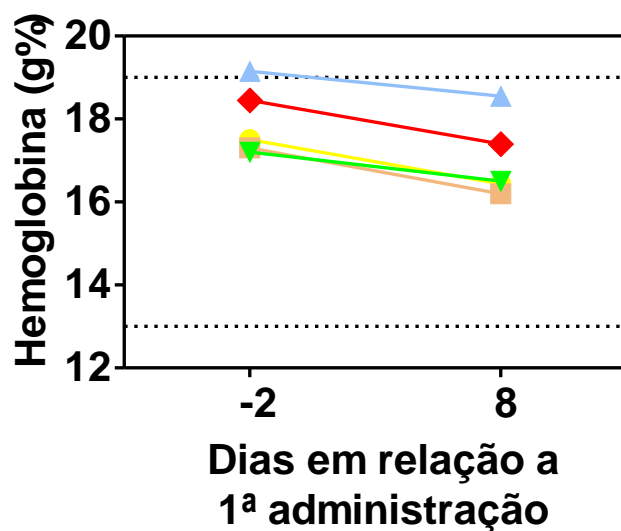


Figura 5 – Níveis de hemoglobina presente nas hemácias de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes. Grupos de 3 cães foram administrados 3 vezes por via intramuscular seguido de eletroporação, com intervalo de 2 dias entre as administrações, com: salina (●); pcDNA3.1 controle negativo (■); pcDNA3.1-scca-IL-12 (▲); pcDNA3.1-ca-IL-2 (▼); pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-ca-IL-2 (◆). As amostras foram coletadas três dias antes da primeira administração de plasmídeos e três dias após a terceira administração de plasmídeos. Os valores de referência (linhas pontilhadas) vão de 13 a 19 g% (Gráfico representativo da série vermelha).

Na série branca, as células do sistema imunológico foram diferenciadas e contadas. Valores relacionados com o número de leucócitos variaram de 12550 ± 1937 cel/mm³ e 13176 ± 3217 entre as coletas de amostras realizadas três dias antes da primeira administração e três dias após a terceira administração. Não foram encontrados valores diferentes entre os grupos administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2 ou discrepantes com os valores de referencia. Foram avaliados também a quantidade de neutrófilos (Figura 6A), linfócitos (Figura 6B), monócitos, eosinófilos e basófilos. Apesar de existir uma tendência ou de diminuição (linfócitos e monócitos) ou de aumento (neutrófilos) no número de células, quando os valores são comparados entre os animais administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2 não existe diferença entre os grupos ou divergência com os valores de referencia, como mostrado na figura 6, gráficos, representativos da série branca.

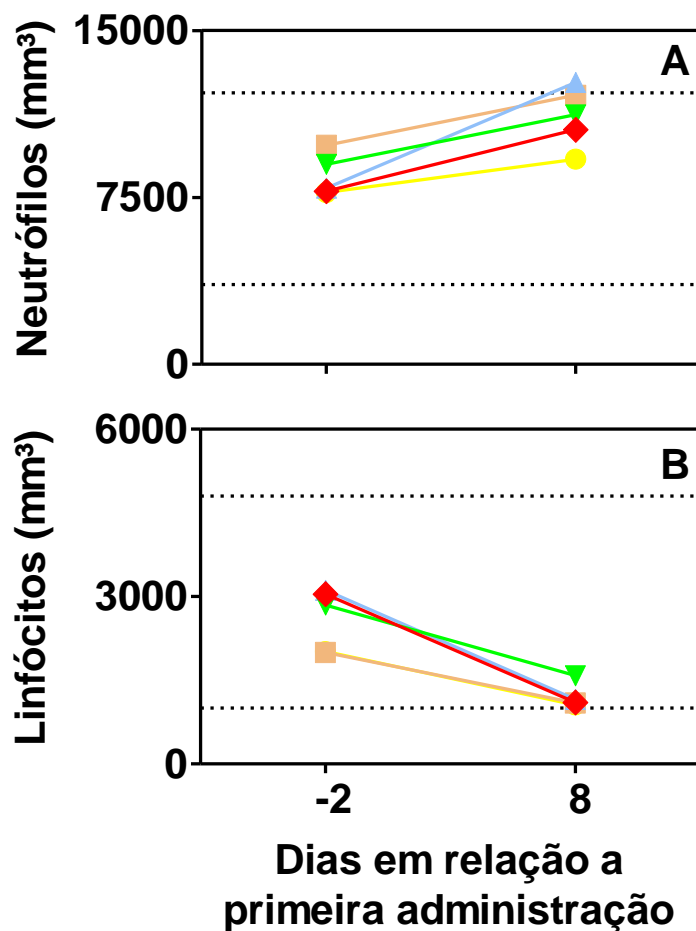


Figura 6 – Número de neutrófilos (Figura 6A) e linfócitos (Figura 6B) de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes. Grupos de 3 cães foram administrados 3 vezes por via intramuscular seguido de eletroporação, com intervalo de 2 dias entre as administrações, com: salina (●); pcDNA3.1 controle negativo (■); pcDNA3.1-scca-IL-12 (▲); pcDNA3.1-ca-IL-2 (▼); pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-ca-IL-2 (◆). As amostras foram coletadas três dias antes da primeira administração de plasmídeos e três dias após a terceira administração de plasmídeos. Os valores de referencia (linhas pontilhadas) para neutrófilos vão de 3600 a 12210 células/mm³ e para linfócitos de 1000 a 4800 células/mm³ (Gráficos representativos da série branca).

Os marcadores da função hepática, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, quando relacionamos a coleta feita três dias antes da primeira administração e três dias após a terceira administração de plasmídeo os valores encontrados ultrapassaram os valores de referencia, chegando a $238,6 \pm 66,0$ g% para aspartato aminotransferase (Figura 7A) e $199,0 \pm 155,7$ g% para alanina aminotransferase, porém não apresentaram diferenças entre os grupos de cães administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2. Efeito inverso foi observado com a concentração de albumina sérica, com uma diminuição entre a coleta feita três dias antes da primeira administração e três dias após a terceira administração de plasmídeo, chegando a $2,0 \pm 0,05$ (Figura 7B), porém não foram encontrados diferenças entre os grupos. Para as demais avaliações, como ureia, creatinina, proteínas totais e globulinas não foram encontradas alterações entre os grupos de cães administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2, de mesmo modo os valores entre a coleta feita três dias antes da primeira administração e três dias após a terceira administração de plasmídeo estavam entre os valores normais.

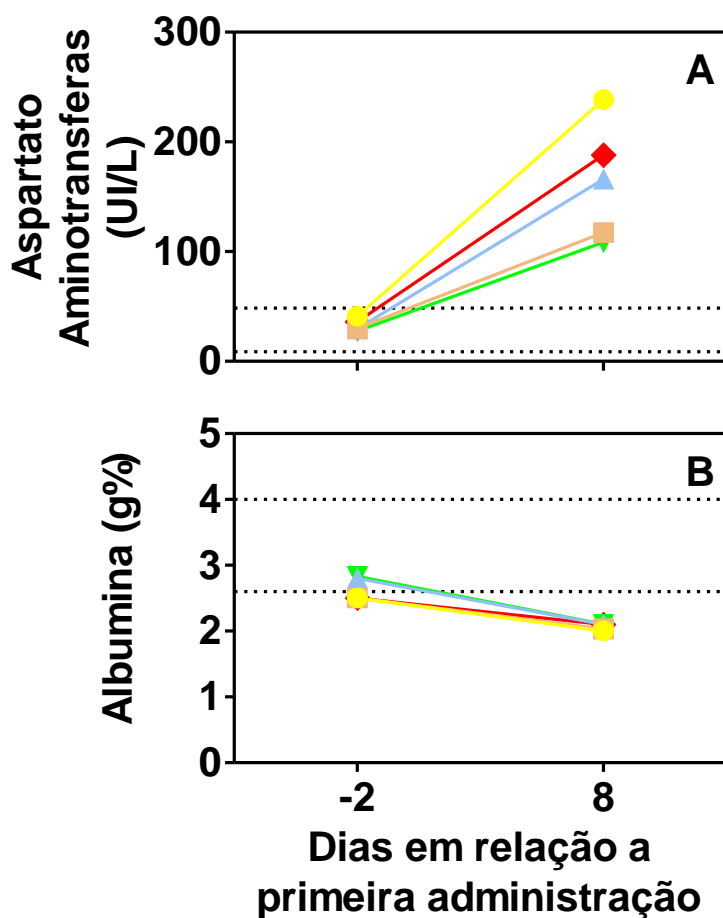


Figura 7 – Níveis da enzima aspartato aminotransferase (Figura 7A) e da proteína albumina (Figura 7B) livres no soro de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes. Grupos de 3 cães foram administrados 3 vezes por via intramuscular seguido de eletroporação, com intervalo de 2 dias entre as administrações, com: salina (●); pcDNA3.1 controle negativo (■); pcDNA3.1-scca-IL-12 (▲); pcDNA3.1-ca-IL-2 (▼); pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-ca-IL-2 (◆). As amostras foram coletadas três dias antes da primeira administração de plasmídeos e três dias após a terceira administração de plasmídeos. Os valores de referência (linhas pontilhadas) para aspartato aminotransferase vão de 8,9 à 48,5 UI/L e para albumina vão de 2,6 a 4,0 g% (Gráficos representativos das enzimas e proteínas séricas).

5.1.2.3. Expressão de citocinas

Para avaliar a expressão de IL-12 e IL-2 foram coletadas amostras 35 e 5 mL de sangue, respectivamente, três dias após a terceira administração nos grupos salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2. Para avaliação indireta da expressão de IL-12, CMNSP foram purificadas e estimuladas *in vitro* com SNs de células COS-7 contendo IL-12 e IL-2 canina recombinante e Con A na concentração de 10 µg/mL e avaliada a expressão de IFN-γ por ELISA (Figura 8). Para IL-2, soros de animais administrados ou não com plasmídeo codificando de IL-2 e/ou IL-12 recombinante canina foram usados para estimular a proliferação de células da linhagem CTLL-2 (Figura 9).

5.1.2.3.1. Avaliação da expressão *in vitro* de IFN-γ em CMNSP de cães administrados com plasmídeos

A produção de IFN-γ, a principal citocina responsável pelo desvio da resposta imune para o perfil T_H1, é estimulada a partir da produção de IL-12. Como parte dos animais não alcançam índices de produção de IFN-γ tão elevados (MAZZOLINI ET AL., 2001), a combinação da IL-12 com a IL-2 tem capacidade de aumentar a produção de IFN-γ (GOLLOB ET AL., 2003; PEREIRA, dados não publicados).

Então, para avaliarmos se a sensibilização com plasmídeo codificante de IL-12 em combinação ou não com plasmídeo codificante de IL-2 caninas recombinantes era capaz de promover uma maior estimulação na produção de IFN-γ, CMNSP de cães administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo,

pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-caIL-2 foram purificadas por gradiente de densidade e estimuladas *in vitro* com Con A e a combinação de SNs de células COS-7 contendo IL-12 e IL-2 caninas recombinantes, como descritos anteriormente.

A sensibilização prévia com plasmídeo codificante de IL-12 em combinação ou não com plasmídeo codificante de IL-2 caninas recombinantes não foi capaz de promover uma maior estimulação de IFN- γ , como descrito na figura 8. Quando CMNSP foram estimuladas com SNs de células COS-7 contendo IL-12 e IL-2 caninas recombinantes, os grupos de cães administrados com salina ou pcDNA3.1 controle negativo (médias de 30,35 ou 239,12 pg/mL, respectivamente) tiveram níveis detectados de IFN- γ semelhantes aos grupos administrados com pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 (médias de 142,45, 142,27 ou 147,31 pg/mL, respectivamente). Efeito semelhante pode ser observado quando CMNSP de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 caninas recombinantes foram estimuladas com concentrações ótimas (Figura 8) e subótimas (dados não mostrados) de Con A.

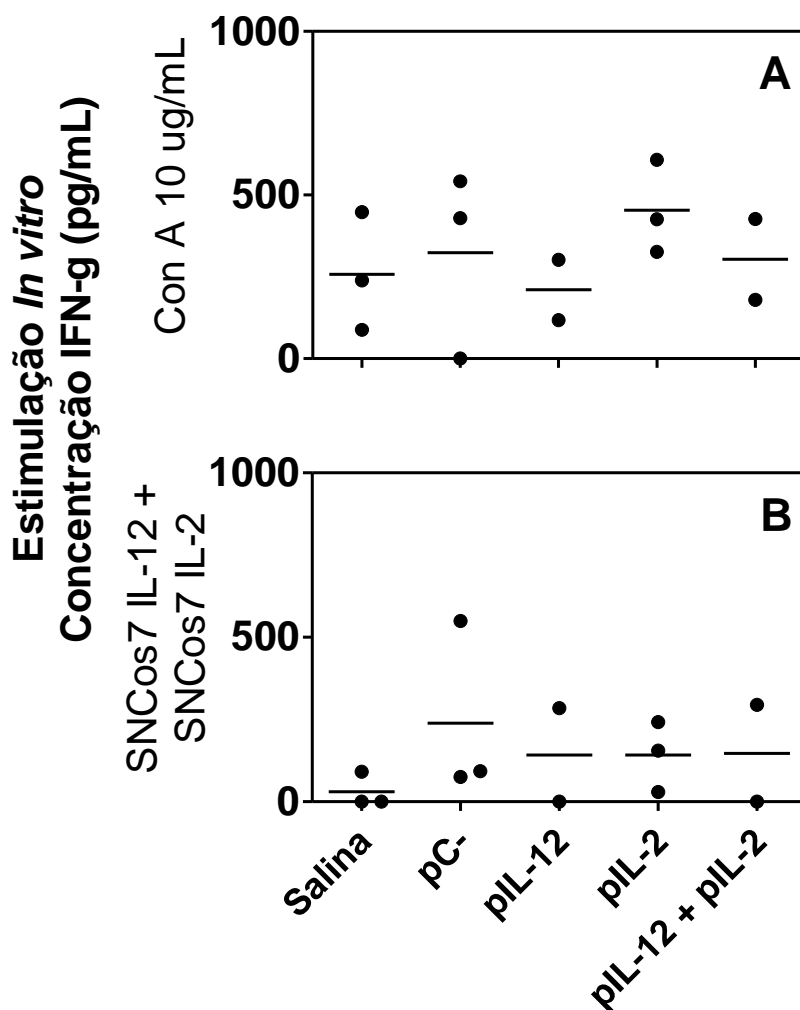


Figura 8 – Avaliação indireta da expressão de IL-12 através da estimulação da produção de IFN- γ por CMNSP de cães sensibilizados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-12 recombinantes. CMNSP de cães administrados com plasmídeos foram cultivadas e estimuladas *in vitro* com Concanavalina A na concentração de 10 μ g/mL (Figura 8A) e a combinação dos sobrenadantes de células COS-7 transfectadas com plasmídeos codificantes de IL-12 e IL-2 recombinantes caninas nas diluições de 1:200 e 1:20, respectivamente (Figura 8B). As amostras foram coletadas três dias após a terceira administração e cultivadas com os estímulos por 2 dias.

5.1.2.3.2. Avaliação da expressão de IL-2 em soro de cães administrados com plasmídeos

Quando células da linhagem CTLL-2 foram estimuladas com T-STIM, controle positivo do ensaio, diluído de 1:16, o nível de emissão de partículas beta por minuto (cpm) atingiu valores de 55603. Para sabermos se a IL-2 canina possuía capacidade de estimular a proliferação de células CTLL-2, utilizamos SN de células COS-7 transfectadas com plasmídeo codificando IL-2 de cão, diluído na mesma concentração que o nosso controle positivo (1:16), como indutor de proliferação. Os valores foram próximos ao nosso controle positivo do ensaio, atingindo valores de 51281 cpm. Os soros de cães administrados com salina, pcDNA3.1 controle negativo, pcDNA3.1-scca-IL-12, pcDNA3.1-ca-IL-2 e pcDNA3.1-scca-IL-12 em combinação com pcDNA3.1-calL-2 foram utilizados, na concentração de 1:2, para estimulação células CTLL-2, já que neste ensaio a presença de IL-2, mesmo em baixas concentrações, é capaz de induzir proliferação das células de linhagem. Em nenhum dos grupos houve proliferação de CTLL-2 como representados na figura 9.

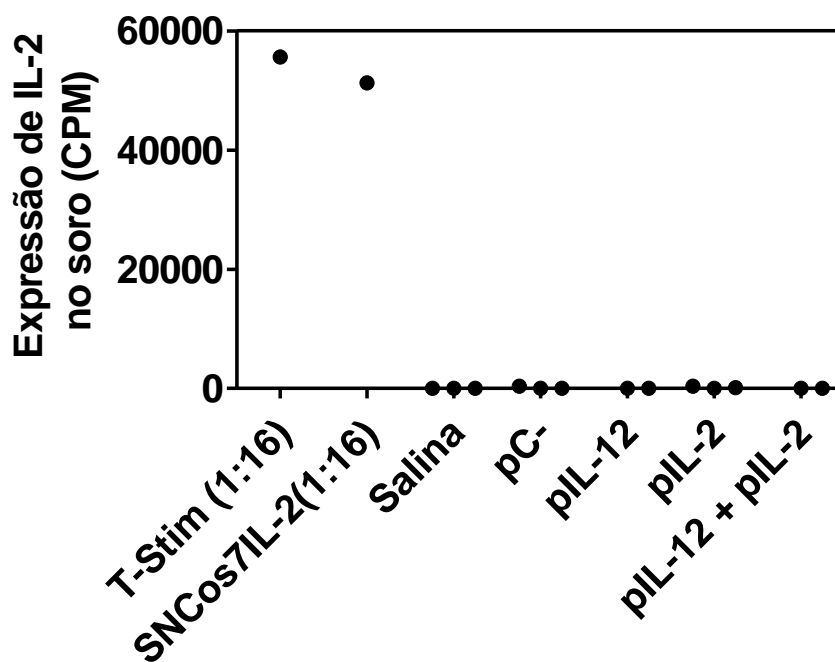


Figura 9 – Avaliação da expressão de IL-2 circulante no soro de cães administrados ou não com plasmídeos codificantes de IL-12 e/ou IL-2 recombinantes a partir da estimulação de células de linhagem sensíveis a presença de IL-2 (CTLL-2). Foram utilizados, como controles positivos, sobrenadantes de esplenócitos de ratos estimulados com Con A (T-STIM) e sobrenadante células COS-7 transfectadas com plasmídeo codificante de IL-2 recombinante canina, ambos na diluição de 1:16. As amostras de soro canino foram coletadas três dias após a terceira administração de plasmídeos e foram utilizadas como estímulos para o ensaio de incorporação de timidina tritiada (linfoproliferação).

5.2. EXPRESSÃO DE IL-12 RECOMBINANTE CANINA EM CÉLULAS DE INSETO POR BACULOVÍRUS

Para determinar se IL-12 é capaz modificar a resposta *in vivo* do sistema imune canino, era necessário produzir a proteína em quantidades consideráveis e acima de tudo com atividade biológica. Em caráter inicial, foram realizados experimentos com larvas de *H. virescens* e células da linhagem BTI-Tn-5B1-4

5.2.1. Produção de IL-12 recombinante canina em larvas de *H. virescens*

5.2.1.1. Infecção e coleta de hemolinfa de larvas de *H. virescens*

Para realização da infecção de larvas de *H. virescens*, os estoques virais foram aplicados e titulados a partir da infecção de células da linhagem BTI-Tn-5B1-4 com: a) baculovírus-Fast1 (controle negativo); b) baculovírus-EGFP (controle positivo); c) baculovírus-scca-IL-12H. Foram obtidos 15 mL de cada SN de BTI-Tn-5B1-4, que foram submetidos à titulação viral, pelo método de diluição limitante. Dentre os títulos obtidos, os SNs de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com baculovírus-Fast1, baculovírus-EGFP e baculovírus-scca-IL-12H tiveram títulos virais de $2,51 \times 10^7$, $1,92 \times 10^6$ e $4,3 \times 10^7$ pfu/mL, respectivamente.

Obtidos os títulos virais, foram infectadas larvas de *H. virescens* foram injetadas com SN de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com baculovírus-Fast1, baculovírus-EGFP ou baculovírus-scca-IL-12H como descrito anteriormente. Foram obtidos cerca de 12 mL de hemolinfa infectada pelo baculovírus-Fast1 e 120 mL de hemolinfa infectada pelo baculovírus-scca-IL-12H. As larvas infectadas com baculovírus-EGFP foram expostas a luz UV, porém, não foram observadas

mudanças na coloração quando comparadas as larvas controle. Já quando os hemócitos (células presentes na hemolinfa de insetos) foram coletados fixados em lâmina de vidro e expostos a luz UV foram visualizadas células de coloração esverdeada quando comparadas aos hemócitos de larvas controle, mostrando que o baculovírus tem potencial para infectar as larvas de *H. virescens*.

5.2.1.2. Purificação de IL-12 recombinante canina de hemolinfa de larvas de *H. virescens*

A construção da IL-12 para expressão em células de inseto foi desenvolvida possuindo uma cauda com seis moléculas de histidina em sua região C-terminal para favorecer a purificação por afinidade. Mesmo assim, a solução alternativa seria a purificação por cromatografia de troca iônica, pois a construção de scca-IL-12H possui um ponto isoelétrico de 6,8 enquanto as principais proteínas que compõem a hemolinfa, denominadas de proteínas de armazenamento, possuem um ponto isoelétrico entre 5,4-6,3 (SLOVAK & REPKA, 1993), o que proporcionaria um nível de separação razoável das proteínas.

5.2.1.2.1. Cromatografia de afinidade

As hemolinfas de larvas infectadas com baculovírus-Fast1 ou baculovírus-scca-IL-12H foram passadas em colunas de Sepharose quelada com níquel (coluna HisTrap HP, GE Healthcare) como mostrado na figura 10. Para uma melhor interpretação da purificação, foi realizada uma purificação com a hemolinfa controle

negativo, onde podemos observar que grande parte das proteínas de armazenamento, principalmente as proteínas de peso entre 66 e 97 kDa (faixa onde a IL-12 provavelmente iria ser visualizada) possuía afinidade ao níquel. Quando realizada a purificação com a hemolinfa que continha IL-12, notamos um efeito idêntico ao ocorrido com a hemolinfa controle negativo, além de tudo, sem a visualização de uma banda entre 65 e 75 kDa que pudéssemos supor que fosse a proteína de interesse. O perfil das proteínas da hemolinfa se mantinha o mesmo quando comparadas antes e depois do processo de purificação (raias 6 e 7, respectivamente), com exceção de proteínas de baixo peso (abaixo de 66 kDa) que com o processo não eram retidas pela coluna.

5.2.1.2.2. Cromatografia de troca iônica

Como alternativa, foi realizada cromatografia de troca iônica para separar proteínas que se ligavam inespecificamente a coluna de afinidade através de uma coluna que desprendia proteínas aderidas à medida que o aumentava a concentração de íons. Já que a IL-12 se diferenciava das proteínas de armazenamento em ponto isoelétrico, realizando uma purificação com pH de 6,5 a IL-12 ficaria retida na coluna enquanto outras proteínas eram descartadas. Após a purificação, não pode ser observado uma banda entre 65 e 75 kDa que pudesse ser correspondente a IL-12, além de que as proteínas de armazenamento também foram retidas na coluna de troca iônica (Figura 11).

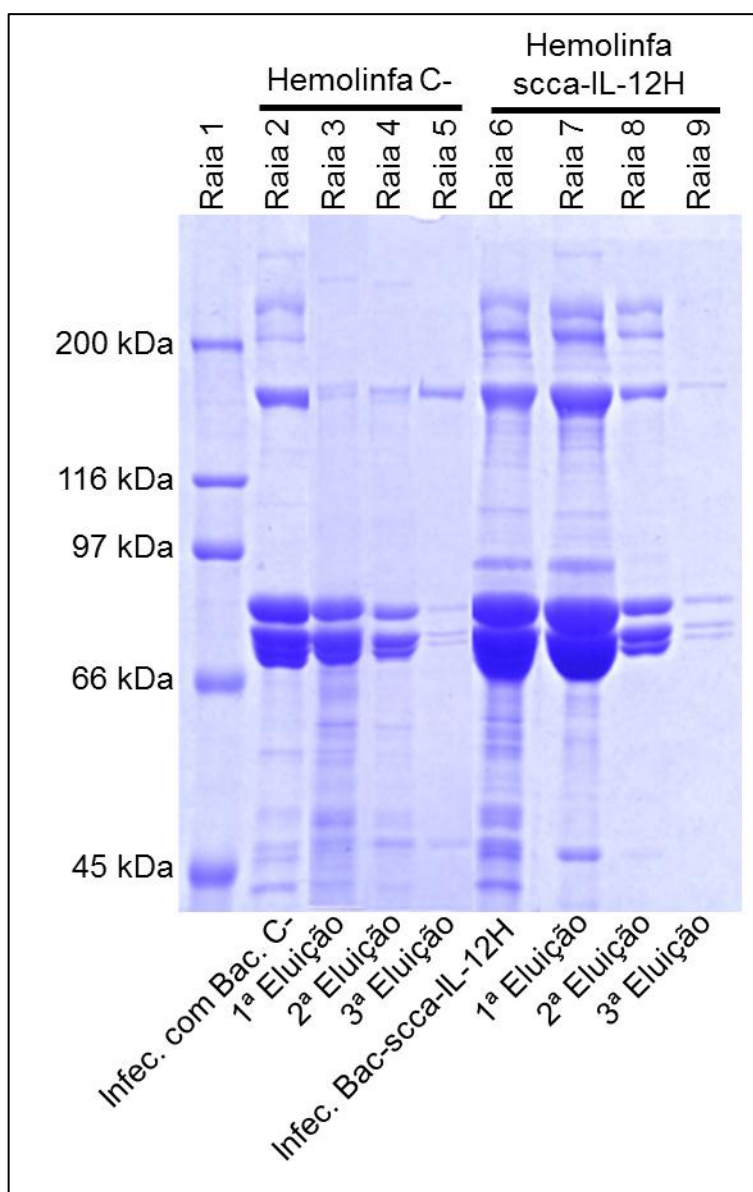


Figura 10 – Avaliação da purificação de sccaIL-12H por cromatografia de afinidade. Hemolinfa de larvas de *H. virescens* infectadas com baculovírus-Fast1 (raia 2 – précoluna; raia 3 – primeira eluição; raia 4 – segunda eluição; raia 5 – terceira eluição) ou baculovírus-scca-IL-12H (raia 6 – précoluna; raia 7 – primeira eluição; raia 8 – segunda eluição; raia 9 – terceira eluição) foram submetidas a cromatografia de afinidade ao níquel.

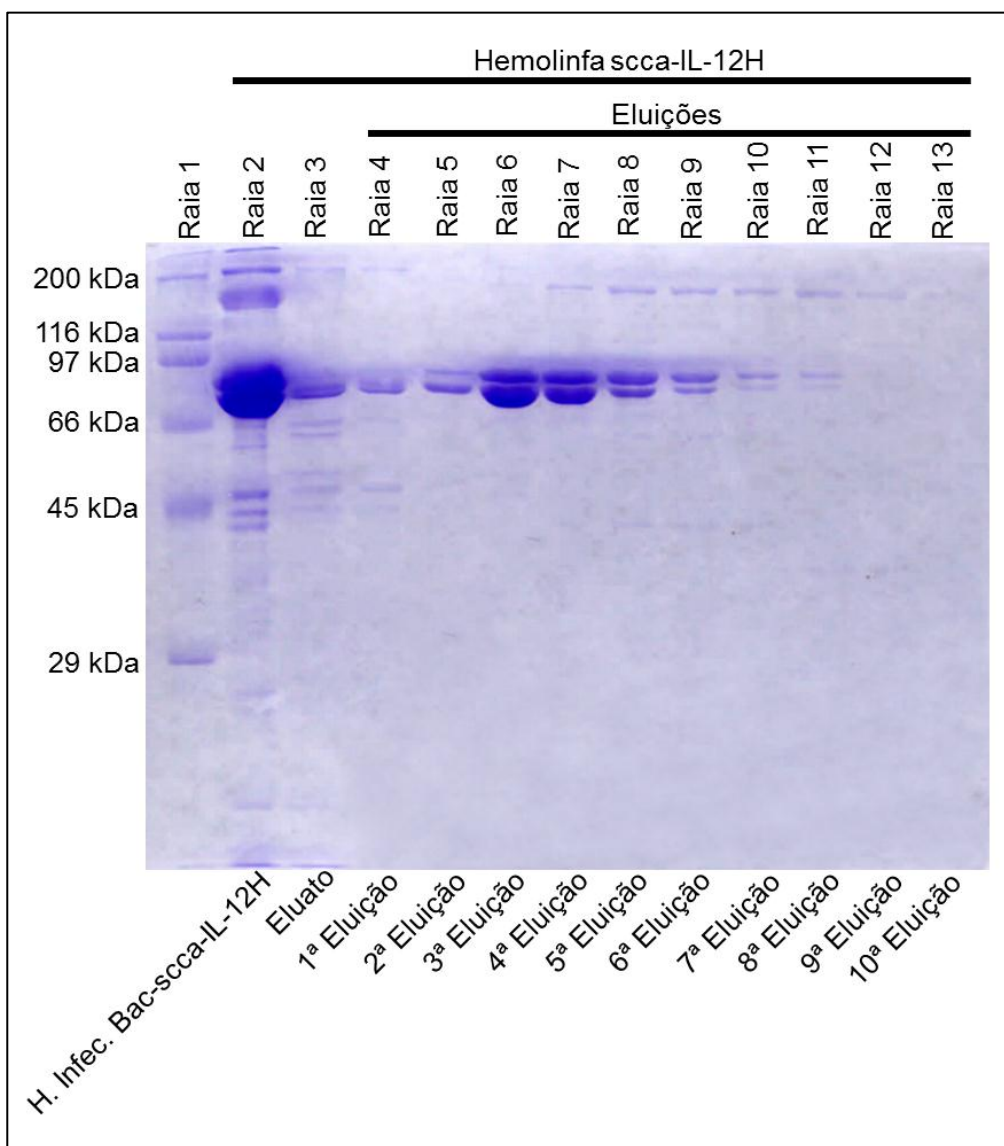


Figura 11 - Avaliação da purificação de sccaIL-12H por cromatografia de troca iônica. Hemolinfa de larvas de *H. virescens* infectadas com baculovírus-scca-IL-12H (raia 2 – précoluna; raia 3 – eluato; raia 4 a 13 – 1ª a 10ª eluições) foram submetidas à cromatografia de afinidade ao níquel.

5.2.2. Produção de IL-12 recombinante canina em células de inseto (BTI-Tn-5B1-4)

Visando avaliar, futuramente, a capacidade de IL-12 canina na forma de proteína recombinante de induzir resposta imune específica do tipo T_H1 , a sequencia codificante de IL-12 canina foi subclonada em um vetor de expressão em células de inseto, o pFastBac1, gerando baculovírus recombinante contendo a sequencia que codifica IL-12 canina em cadeia única em seu genoma capazes de infectar e promover expressão e secreção da proteína biologicamente ativa.

5.2.2.1. Avaliação da expressão por SDS-Page

A expressão da IL-12 (tanto a molécula antiga de scca-IL-12H quanto a molécula nova de SLgp67-scca-IL-12EH, descritas anteriormente), foi avaliada em sobrenadantes e lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus recombinante em MOI 10, inicialmente, através de SDS-PAGE, como descritos anteriormente. Em paralelo, foi avaliada a expressão de SLgp67-EGFP-EH, como controle positivo.

Quando as amostras de SNs de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus recombinante contendo sequencia codificante de scca-IL-12H ou SLgp67-scca-IL-12EH foram comparadas com a amostra de lisado de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus controle negativo não pode ser observada qualquer diferença entre as bandas, resultado semelhante ocorreu com a amostra de lisado de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus recombinante contendo a sequencia codificante de SLgp67-EGFP-EH, nosso controle positivo de

infecção. Já quando comparamos os lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus recombinante contendo sequência codificante de scca-IL-12H ou SLgp67-scca-IL-12EH pode ser observado que, proteínas de peso molecular de 54 e 58 kDa, não estavam presentes nos lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus controle negativo ou baculovírus contendo a sequência codificante de SLgp67-EGFP-EH, porém entre 65 e 75 kDa, faixa de peso correspondente a IL-12 íntegra, sendo este o primeiro indício de que a proteína pode estar sendo produzida mas possivelmente sendo degradada, como mostrado na figura 12.

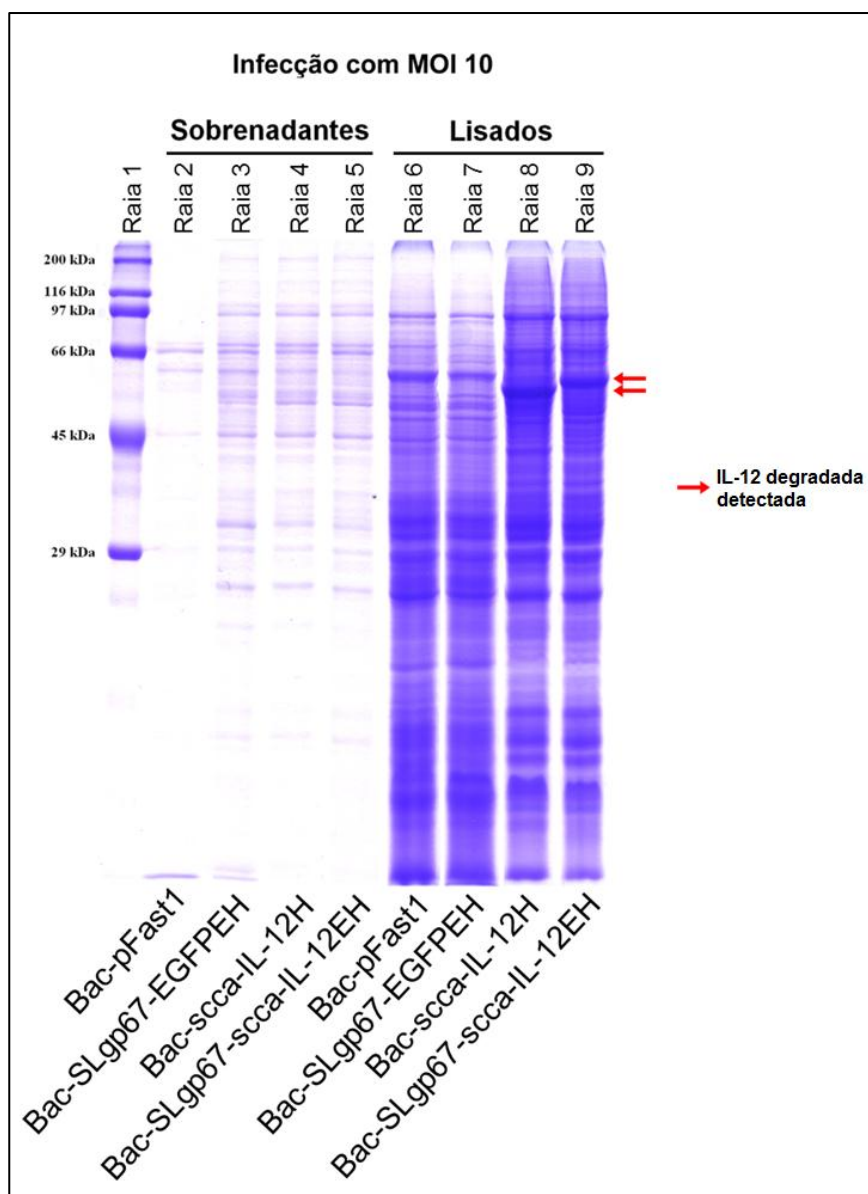


Figura 12 - Avaliação da expressão de scca-IL-12EH em SDS-Page. Raia 1 – Marcador de peso molecular; Raias 2, 3, 4 e 5 – sobrenadantes de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com baculovírus controle negativo, com inserto de SLgp67-EGFPEH, com inserto de scca-IL-12H, com inserto de SLgp67-scca-IL-12EH, respectivamente; Raias 6, 7, 8 e 9 – lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com baculovírus controle negativo, com inserto de SLgp67-EGFPEH, com inserto de scca-IL-12H, com inserto de SLgp67-scca-IL-12EH, respectivamente.

5.2.2.2. Identificação de IL-12 por Western Blot

Com os resultados obtidos pela análise em SDS-PAGE, partimos para identificação por Western Blot específico para proteínas com cauda de histidina na região carboxi-terminal. A identificação da IL-12, de forma semelhante à análise por SDS-PAGE, foi avaliada em sobrenadantes e lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus recombinante com MOI 10. Foram avaliadas as expressões de SLgp67-EGFP-EH, scca-IL-12H (molécula antiga de IL-12 canina) e SLgp67-scca-IL-12EH, como representados na figura 13.

Quando comparamos SNs de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus controle negativo (raia 2) e infectadas por baculovírus codificante de SLgp67-EGFP-EH (raia 3), duas bandas de 35 e 33 kDa correspondente a molécula de EGFP com cauda de histidina na região c-terminal íntegra e degradada, respectivamente puderam ser detectadas mostrando que o processo de produção de proteínas através da infecção de células de inseto por baculovírus recombinante é válido para a obtenção de maiores quantidades de proteína já em sua conformação original. O SN de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com baculovírus codificante de scca-IL-12H (raia 4) apresentou uma banda de 70 kDa enquanto o SN de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com baculovírus codificante de SLgp67-scca-IL-12EH (raia 5) apresentou duas bandas de 72 e 75 kDa, mostrando que a IL-12, tanto na construção antiga quanto na nova estão sendo produzidas e secretadas.

Foram avaliados também os lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus. Quando comparados os lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus controle negativo (raia 6) e infectadas por baculovírus codificante de SLgp67-EGFP-EH (raia 7), o resultado foi semelhante ao SN, apresentando uma

banda de 35 kDa, porém com uma maior intensidade, mostrando que grande parte da proteína produzida não foi secretada. Com os lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas por baculovírus codificantes de scca-IL-12H (raia 8) ou SLgp67-scca-IL-12EH (raia 9), foram reconhecidas diversas bandas com peso molecular abaixo de 75 kDa, porém as bandas correspondentes as identificadas nos SNs ou não foram identificadas ou estavam em baixa concentração, mostrando que possivelmente a IL-12 está sendo produzida porém com baixos níveis de secreção.

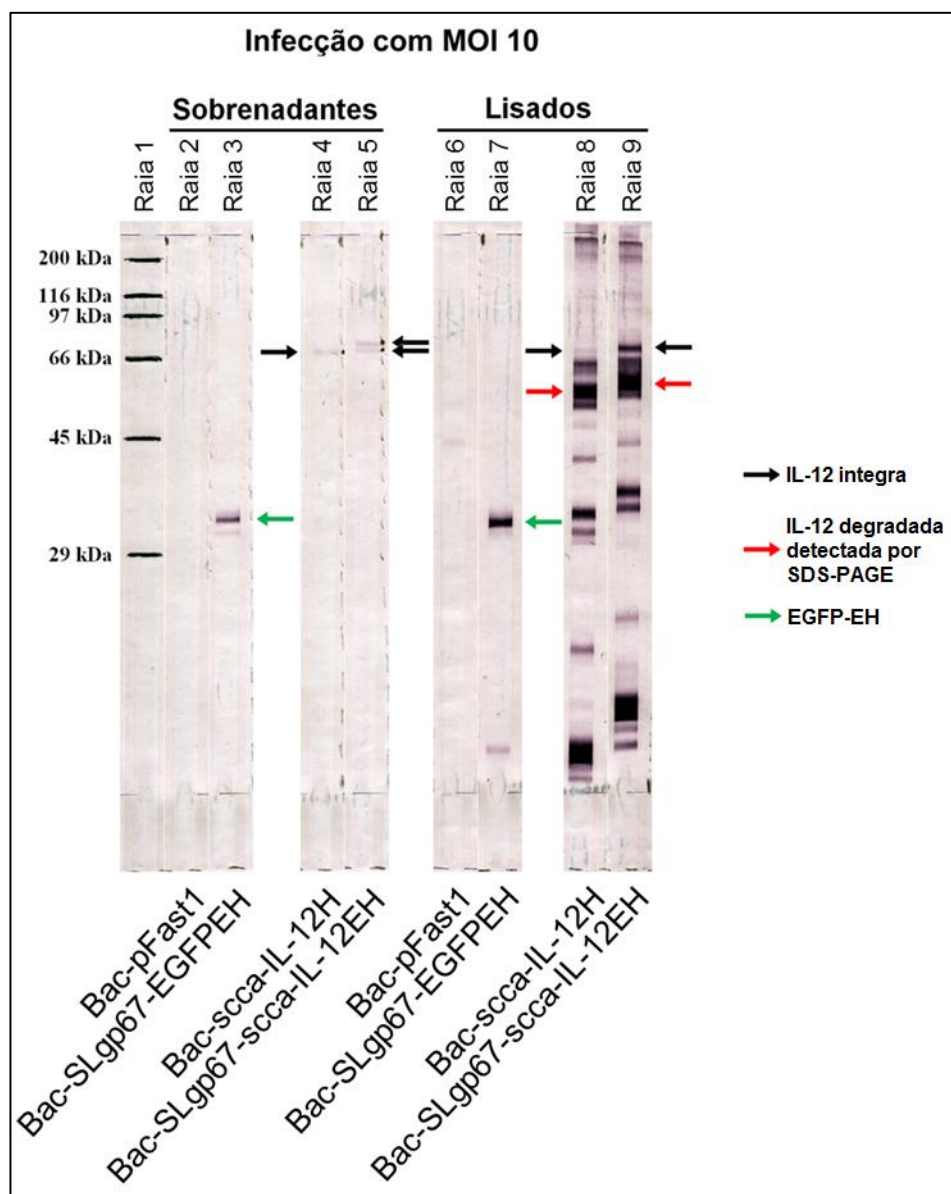


Figura 13 – Identificação de SLgp67-scca-IL-12EH por Western Blot específico α -Histidina. Raia 1 – Marcador de peso molecular; Raias 2, 3, 4 e 5 – sobrenadantes de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com baculovírus controle negativo, com inserto de SLgp67-EGFPEH, com inserto de scca-IL-12H, com inserto de SLgp67-scca-IL-12EH, respectivamente; Raias 6, 7, 8 e 9 – lisados de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com baculovírus controle negativo, com inserto de SLgp67-EGFPEH, com inserto de scca-IL-12H, com inserto de SLgp67-scca-IL-12EH, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

Visando avaliar o potencial uso de IL-12 e IL-2 em métodos imunoterápicos para leishmaniose visceral canina, no presente trabalho cães saudáveis foram submetidos a administração de plasmídeos codificantes IL-12 canina (DOS SANTOS ET AL., 2004) e/ou IL-2 canina (PEREIRA, 2006). Além disso, visando a produção de IL-12 canina, duas construções de cDNA cada uma com uma sequência líder e as sequências que codificam o produto dos dois genes que compõem IL-12 foram elaboradas em baculovírus, uma delas no presente trabalho. A infecção de células de inseto da linhagem BTI-Tn5-B1-4 com cada uma das construções resultou na expressão de IL-12 recombinante no citoplasma e no sobrenadante de cultura.

IL-12 pode favorecer o desenvolvimento de resposta imune do tipo T_H1 quando coadministrada com antígenos isoladamente ou em associação com outras citocinas como IL-2 (AFONSO ET AL., 1994; DEBLAKER-HOHE ET AL., 1995), IL-7 (MEHROTRA ET AL., 1995), IL-18 (KISHIDA ET AL., 2001) que pode ser útil na promoção de respostas protetoras contra a leishmaniose visceral em cães.

Previamente em nosso laboratório foram clonadas IL-12 canina, de forma a produzir de proteína de fusão de cadeia única (DOS SANTOS ET AL., 2004) e IL-2 canina (PEREIRA, 2006). Plasmídeo (pcDNA3.1) contendo o cDNA de cada uma dessas duas citocinas foi usada para transfectar células COS-7. A combinação de sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-scca-IL-12 e pcDNA3.1-IL-2 foi capaz de promover a expressão de IFN- γ com em CMNSP de cães saudáveis, ao passo que nem sempre sobrenadante de células COS-7 transfectadas apenas com pcDNA3.1-scca-IL-12 era capaz de mediar o tal efeito

(PEREIRA, 2006). Além disso, camundongos BALB/c injetados com uma dose 50 µg de plasmídeo codificando IL-12 murina, clonada de forma a produzir proteína de fusão de cadeia única (pcDNA3.1-scmu-IL-12), por via muscular e eletroporação, apresentaram hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenomegalia (PINHEIRO, 2007), 10 dias depois da administração do plasmídeo em comparação com animais que receberam plasmídeo sem inserto (pcDNA3.1). Em camundongos C3H/HeJ injetados duas vezes com pcDNA3.1-scmu-IL-12, 50 µg/dose, com intervalo de dois dias entre as injeções, foram observadas produção de IFN-γ (detectada no soro), esplenomegalia e linfadenomegalia 10 dias depois da administração do plasmídeo em comparação com animais que receberam plasmídeo controle negativo, pcDNA3.1 (SANTOS, 2007). No presente trabalho foi realizado um experimento piloto, com três cães por grupo, no qual os animais foram injetados com plasmídeo, por via muscular e eletroporação, com pcDNA3.1-scca-IL-12 ou pcDNA3.1-scca-IL-12 e pcDNA3.1-IL-2. Esses animais receberam três doses de plasmídeo, com intervalo de dois dias entre cada duas doses consecutivas, sendo cada dose de plasmídeo de 500 µg de DNA. Surpreendentemente, os animais injetados com plasmídeo pcDNA3.1-scca-IL-12 ou pcDNA3.1-scca-IL-12 e pcDNA3.1-IL-2 não apresentaram qualquer indicio da expressão das citocinas, comparados com animais que foram injetados com plasmídeo pcDNA3.1, pcDNA3.1-IL-2 ou salina. Os animais injetados com pcDNA3.1-scca-IL-12 ou pcDNA3.1-scca-IL-12 e pcDNA3.1-IL-2 falharam em apresentar sensibilizar CMNSP a produzirem IFN-γ após estimulação adicional *in vitro*, 3 dias após a terceira administração de plasmídeo. Conforme mencionado acima, os plasmídeos pcDNA3.1-scca-IL-12 e pcDNA3.1-IL-2 são capazes de produzir as respectivas proteínas recombinantes com atividade funcional. Por isso, uma das explicações possíveis seria que a quantidade de plasmídeo administrada

em cada dose não tenha sido suficientemente grande. De fato, acredita-se que administração de plasmídeo em animais de maior porte, em comparação com a injeção de plasmídeo em camundongos, não seja muito eficiente (BABIUK ET AL., 2003). Quezada e colaboradores, administraram até três doses plasmídeo codificando IL-12 em associação com polivinilpirrolidona a 5%, em doses de até 18 mg de DNA/kg, a cada duas semanas, em macacos *Cynomolgus* (QUEZADA ET AL., 2002). Esses autores relataram ausência de efeitos tóxicos, porém, infelizmente, não descreveram atividades biológicas consequentes a administração do plasmídeo. Daud e colaboradores, 2008, observaram a expressão de IL-12 e IFN- γ , após injeção de 900 a 2.950 μ g de plasmídeo codificando IL-12 por eletroporação em nódulos de melanoma em pacientes humanos, no tecido tumoral (DAUD ET AL., 2008). Em nosso experimente, outro motivo para a falha de detecção de sensibilização de CMNSP de cães pode ter sido o período decorrido entre a administração de plasmídeo e a avaliação de CMNSP, uma vez que Saldarriaga e colaboradores, 2006, observaram tal sensibilização (detectada por mRNA de IFN- γ) dois meses após as injeções, em cães que haviam sido injetados com 100 μ g de plasmídeo codificando IL-12 canina a cada mês (SALDARRIAGA ET AL., 2006).

Visando a produção de IL-12 para determinar doses apropriadas para o uso no cão, foram utilizadas construções elaboradas em baculovírus usando o sistema Bac-to-bac para infectar células de linhagem de inseto (BTI-Tn5-B1-4) ou larvas de inseto, como por exemplo, larvas de *Heliothis virescens* (KULAKOSKY ET AL., 1998; WU ET AL., 2004). Para isso, previamente havia sido elaborada em nosso laboratório uma construção em baculovírus (“Autografa californica multiple nuclear polyhedrosis vírus”, AcMNPV) com sequência líder de p40 de IL-12 de cão. No presente trabalho, foi elaborada uma nova construção para a expressão de IL-12

canina na forma proteína de fusão de cadeia única, utilizando-se a sequência líder da proteína gp67 de AcMNPV (WHITFORD ET AL., 1989), principal proteína direcionada para o retículo endoplasmático em células de inseto durante a infecção pelo vírus. O sistema baculovírus/células de inseto permite a produção de proteínas recombinantes glicosidadas e com atividade biológica (KULAKOSKY ET AL., 1998; WU ET AL., 2004).

Larvas de *Heliothis virescens* foram infectadas usando-se a construção de baculovírus elaborada com a sequência líder de p40 de IL-12 canina, conforme método descrito por O'REILLY e colaboradores, 1994 (O'REILLY ET AL., 1994), e a hemolinfa foi coletada. Experimentos foram realizados visando a purificação de IL-12 recombinante, que possui uma cauda de histidina, da hemolinfa através de cromatografia de afinidade com colunas de Sepharose-níquel (Histrap), os quais não tiveram êxito. Isso decorreu do fato de haver competição pela ligação na coluna entre IL-12 e proteínas de armazenamento de *Heliothis virescens* presentes na hemolinfa (CHA ET AL., 1999). Ainda com o objetivo de purificar IL-12 da hemolinfa, foram realizados experimentos usando-se cromatografia de troca iônica, já que a IL-12 recombinante canina exibe um ponto isoelétrico (PI) predito de 6,8 e proteínas de armazenamento da hemolinfa de larvas de *Heliothis virescens* apresentam um PI entre 5,4 e 6,3; (SLOVAK & REPKA, 1993). Embora um dos ensaios tenham sido realizados com o tampão de ligação com pH de 6,5 não ocorreu um fracionamento de modo a surgir banda distinta para IL-12 na análise por SDS-PAGE. Uma possibilidade seria inicialmente separar IL-12 das proteínas de armazenamento presentes na hemolinfa por fracionamento por peso molecular e depois por cromatografia de afinidade, uma vez que as últimas são proteínas poliméricas com peso molecular elevado comparadas com IL-12 (HAUNERLAND,

1996; LECLERC & MILLER, 1990; TOJO ET AL., 1997);. No entanto, como a hemolinfa foi coletada em uma solução contendo feniltiouréia, a qual absorve luz ultravioleta, o processo de purificação por peso molecular ficou prejudicado. Somente recentemente, foi observada em nosso laboratório que a diálise da hemolinfa contra tampão salina de inseto elaborada por Mead e colaboradores (MEAD ET AL., 1986), pode ser realizada para remover feniltiouréia sem permitir melanização (PAIXÃO ET AL., dados não publicados)

Células da linhagem de inseto BTI-Tn5-B1-4 foram infectadas com cada uma das construções em baculovírus elaboradas em nosso laboratório, com a sequência líder de p40 de IL-12 canina ou com a sequência líder de gp67 de AcMNPV, com um multiplicidade de infecção (MOI) de 10 partículas viras para cada célula de inseto e células ou sobrenadante de cultura foram avaliados 72 h após a infecção. Nesses experimentos, detectou-se IL-12 recombinante canina em baixa concentração no sobrenadante e em alta concentração no lisado celular, através de SDS-PAGE e/ou *Western blot* usando-se anticorpos anti-histidina. No lisado celular, foram observadas várias bandas correspondentes a IL-12, através de SDS-PAGE e/ou *Western blot*, sugerindo que a proteína está sendo degradada no interior das células. Em algumas oportunidades proteínas recombinantes podem ficar retidas e/ou degradadas parcialmente no interior de células quando expressas usando-se o sistema baculovírus células de inseto (KABA ET AL., 2004; LEDUC ET AL., 2000). Alguns autores sugerem que a degradação e/ou baixa secreção de proteínas recombinantes em células de inseto infectadas por baculovírus podem estar relacionadas a proteínas do vírus em especial chitinase e catepsina, além de proteínas (produtos dos genes p26, p10 e p74 do vírus) que competem pelos

recursos das células destinados a secreção proteica (HITCHMAN ET AL., 2009a; HITCHMAN ET AL., 2009b; HITCHMAN ET AL., 2010; KABA ET AL., 2004).

Como perspectivas deverá ser tentada 1) a purificação de IL-12 recombinante do cão a partir da hemolinfa de *Heliothis virescens* depois da remoção de feniltiouréia por dialise contra o tampão de Mead, 2) otimização da expressão de IL-12 de células BTI-Tn5-B1-4 infectadas pelas construções em baculovírus variando-se MOI e tempo de coleta de sobrenadante de cultura após a infecção; 3) subclonagem de scca-IL-12 em um baculovírus recombinante desprovido de chitinase e catepsina (que nos foi gentilmente doado pela Dra. Monique Oers, Laboratório de Virologia, Universidade de Wageningen, Holanda) ou desprovido de chitinase, catepsina, p26, p10 e p74 (FlashBacultra, Oxford Expression Technologies, Reino Unido).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A administração de IL-12 e/ou IL-2 canina na forma de plasmídeo, nas condições avaliadas, não foi capaz de promover efeitos biológicos em cães.
- Os experimentos para purificação IL-12 recombinante de cão, a partir da hemolinfa de larva de *H. virescens* infectada por baculovírus recombinantes, em uma só etapa de cromatografia, não resultaram em sucesso.
- Células de inseto da linhagem BTI-Tn5-B1-4 infectadas com baculovírus recombinantes produzem IL-12, porém a maior parte da proteína expressa fica retida no interior das células e é, aparentemente, degradada.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, L. C., SCHARTON, T. M., VIEIRA, L. Q., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G. & SCOTT, P. (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Science**, 263(5144), 235-237.
- ASTE-AMEZAGA, M., MA, X., SARTORI, A. & TRINCHIERI, G. (1998). Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. **J Immunol**, 160(12), 5936-5944.
- ATKINS, M. B., GOULD, J. A., ALLEGRETTA, M., LI, J. J., DEMPSEY, R. A., RUDDERS, R. A., PARKINSON, D. R., REICHLIN, S. & MIER, J. W. (1986). Phase I evaluation of recombinant interleukin-2 in patients with advanced malignant disease. **J Clin Oncol**, 4(9), 1380-1391.
- ATKINS, M. B., ROBERTSON, M. J., GORDON, M., LOTZE, M. T., DECOSTE, M., DUBOIS, J. S., RITZ, J., SANDLER, A. B., EDINGTON, H. D., GARZONE, P. D., MIER, J. W., CANNING, C. M., BATTIATO, L., TAHARA, H. & SHERMAN, M. L. (1997). Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. **Clin Cancer Res**, 3(3), 409-417.
- BABIUK, L. A., PONTAROLLO, R., BABIUK, S., LOEHR, B. & VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. (2003). Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. **Vaccine**, 21(7-8), 649-658.
- BRUNDA, M. J., LUISTRO, L., WARRIER, R. R., WRIGHT, R. B., HUBBARD, B. R., MURPHY, M., WOLF, S. F. & GATELY, M. K. (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. **J Exp Med**, 178(4), 1223-1230.
- CHA, H. J., DALAL, N. G., PHAM, M. Q. & BENTLEY, W. E. (1999). Purification of human interleukin-2 fusion protein produced in insect larvae is facilitated by fusion with green fluorescent protein and metal affinity ligand. **Biotechnol Prog**, 15(2), 283-286.
- CHAN, S. H., KOBAYASHI, M., SANTOLI, D., PERUSSIA, B. & TRINCHIERI, G. (1992). Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. **J Immunol**, 148(1), 92-98.
- CHAN, S. H., PERUSSIA, B., GUPTA, J. W., KOBAYASHI, M., POSPISIL, M., YOUNG, H. A., WOLF, S. F., YOUNG, D., CLARK, S. C. & TRINCHIERI, G. (1991). Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **J Exp Med**, 173(4), 869-879.
- CHIZZONITE, R., TRUITT, T., PODLASKI, F. J., WOLITZKY, A. G., QUINN, P. M., NUNES, P., STERN, A. S. & GATELY, M. K. (1991). IL-12: monoclonal

antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biologic activity on activated human lymphoblasts. **J Immunol**, 147(5), 1548-1556.

D'ANDREA, A., ASTE-AMEZAGA, M., VALIANTE, N. M., MA, X., KUBIN, M. & TRINCHIERI, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma- production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J Exp Med**, 178(3), 1041-1048.

DAUD, A. I., DECONTI, R. C., ANDREWS, S., URBAS, P., RIKER, A. I., SONDAK, V. K., MUNSTER, P. N., SULLIVAN, D. M., UGEN, K. E., MESSINA, J. L. & HELLER, R. (2008). Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. **J Clin Oncol**, 26(36), 5896-5903.

DE JONG, R., JANSON, A. A., FABER, W. R., NAAFS, B. & OTTENHOFF, T. H. (1997). IL-2 and IL-12 act in synergy to overcome antigen-specific T cell unresponsiveness in mycobacterial disease. **J Immunol**, 159(2), 786-793.

DEBLAKER-HOHE, D. F., YAMAUCHI, A., YU, C. R., HORVATH-ARCIDIACONO, J. A. & BLOOM, E. T. (1995). IL-12 synergizes with IL-2 to induce lymphokine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK cells. **Cell Immunol**, 165(1), 33-43.

DOS SANTOS, L. R., BARROUIN-MELO, S. M., CHANG, Y. F., OLSEN, J., MCDONOUGH, S. P., QUIMBY, F., DOS SANTOS, W. L., PONTES-DE-CARVALHO, L. C. & OLIVEIRA, G. G. (2004). Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, 98(1-2), 43-48.

DU, C. & SRIRAM, S. (1998). Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. **J Leukoc Biol**, 64(1), 92-97.

ETTINGHAUSEN, S. E., LIPFORD, E. H., 3RD, MULE, J. J. & ROSENBERG, S. A. (1985). Systemic administration of recombinant interleukin 2 stimulates in vivo lymphoid cell proliferation in tissues. **J Immunol**, 135(2), 1488-1497.

GATELY, M. K., WARRIER, R. R., HONASOGE, S., CARVAJAL, D. M., FAHERTY, D. A., CONNAUGHTON, S. E., ANDERSON, T. D., SARMIENTO, U., HUBBARD, B. R. & MURPHY, M. (1994). Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN-gamma in vivo. **Int Immunol**, 6(1), 157-167.

GILLIS, S., BAKER, P. E., RUSCETTI, F. W. & SMITH, K. A. (1978a). Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. **J Exp Med**, 148(4), 1093-1098.

GILLIS, S., FERM, M. M., OU, W. & SMITH, K. A. (1978b). T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. **J Immunol**, 120(6), 2027-2032.

- GILLIS, S., SMITH, K. A. & WATSON, J. (1980). Biochemical characterization of lymphocyte regulatory molecules. II. Purification of a class of rat and human lymphokines. **J Immunol**, 124(4), 1954-1962.
- GOLLOB, J. A., VEENSTRA, K. G., PARKER, R. A., MIER, J. W., MCDERMOTT, D. F., CLANCY, D., TUTIN, L., KOON, H. & ATKINS, M. B. (2003). Phase I trial of concurrent twice-weekly recombinant human interleukin-12 plus low-dose IL-2 in patients with melanoma or renal cell carcinoma. **J Clin Oncol**, 21(13), 2564-2573.
- GORDON, J. & MACLEAN, L. D. (1965). A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro. **Nature**, 208(5012), 795-796.
- GUBLER, U., CHUA, A. O., SCHOENHAUT, D. S., DWYER, C. M., MCCOMAS, W., MOTYKA, R., NABAVI, N., WOLITZKY, A. G., QUINN, P. M., FAMILLETTI, P. C. & ET AL. (1991). Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88(10), 4143-4147.
- HAUNERLAND, N. H. (1996). Insect storage proteins: gene families and receptors. **Insect Biochem Mol Biol**, 26(8-9), 755-765.
- HEINZEL, F. P., SCHOENHAUT, D. S., RERKO, R. M., ROSSER, L. E. & GATELY, M. K. (1993). Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J Exp Med**, 177(5), 1505-1509.
- HELLER, R., SCHULTZ, J., LUCAS, M. L., JAROSZESKI, M. J., HELLER, L. C., GILBERT, R. A., MOELLING, K. & NICOLAU, C. (2001). Intradermal delivery of interleukin-12 plasmid DNA by in vivo electroporation. **DNA Cell Biol**, 20(1), 21-26.
- HITCHMAN, R. B., POSSEE, R. D., CROMBIE, A. T., CHAMBERS, A., HO, K., SIATERLI, E., LISSINA, O., STERNARD, H., NOVY, R., LOOMIS, K., BIRD, L. E., OWENS, R. J. & KING, L. A. (2009a). Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells. **Cell Biol Toxicol**, 26(1), 57-68.
- HITCHMAN, R. B., POSSEE, R. D. & KING, L. A. (2009b). Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. **Recent Pat Biotechnol**, 3(1), 46-54.
- HITCHMAN, R. B., POSSEE, R. D., SIATERLI, E., RICHARDS, K. S., CLAYTON, A. J., BIRD, L. E., OWENS, R. J., CARPENTIER, D. C., KING, F. L., DANQUAH, J. O., SPINK, K. G. & KING, L. A. (2010). Improved expression of secreted and membrane-targeted proteins in insect cells. **Biotechnol Appl Biochem**, 56(3), 85-93.
- HSIEH, C. S., MACATONIA, S. E., TRIPP, C. S., WOLF, S. F., O'GARRA, A. & MURPHY, K. M. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, 260(5107), 547-549.

- KABA, S. A., SALCEDO, A. M., WAFULA, P. O., VLAK, J. M. & VAN OERS, M. M. (2004). Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins. **J Virol Methods**, 122(1), 113-118.
- KASAKURA, S. & LOWENSTEIN, L. (1965). A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leukocyte cultures. **Nature**, 208(5012), 794-795.
- KAUFMAN, H. L., FLANAGAN, K., LEE, C. S., PERRETTA, D. J. & HORIG, H. (2002). Insertion of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes into vaccinia virus results in effective anti-tumor responses without toxicity. **Vaccine**, 20(13-14), 1862-1869.
- KISHIDA, T., ASADA, H., SATOH, E., TANAKA, S., SHINYA, M., HIRAI, H., IWAI, M., TAHARA, H., IMANISHI, J. & MAZDA, O. (2001). In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. **Gene Ther**, 8(16), 1234-1240.
- KOBAYASHI, M., FITZ, L., RYAN, M., HEWICK, R. M., CLARK, S. C., CHAN, S., LOUDON, R., SHERMAN, F., PERUSSIA, B. & TRINCHIERI, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J Exp Med**, 170(3), 827-845.
- KULAKOSKY, P. C., HUGHES, P. R. & WOOD, H. A. (1998). N-Linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. **Glycobiology**, 8(7), 741-745.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227(259), 680-685.
- LECLERC, R. F. & MILLER, S. G. (1990). Identification and molecular analysis of storage proteins from *Heliothis virescens*. **Arch Insect Biochem Physiol**, 14(3), 131-150.
- LEDUC, P. R., WHITELEY, E. M., BAO, G. & BETENBAUGH, M. J. (2000). Investigating the secretory pathway of the baculovirus-insect cell system using a secretory green fluorescent protein. **Biotechnol Prog**, 16(5), 716-723.
- LEONARD, J. P., SHERMAN, M. L., FISHER, G. L., BUCHANAN, L. J., LARSEN, G., ATKINS, M. B., SOSMAN, J. A., DUTCHER, J. P., VOGELZANG, N. J. & RYAN, J. L. (1997). Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. **Blood**, 90(7), 2541-2548.
- LIESCHKE, G. J., RAO, P. K., GATELY, M. K. & MULLIGAN, R. C. (1997). Bioactive murine and human interleukin-12 fusion proteins which retain antitumor activity in vivo. **Nat Biotechnol**, 15(1), 35-40.

- LUCAS, M. L. & HELLER, R. (2001). Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. **Mol Ther**, 3(1), 47-53.
- LUCKOW, V. A., LEE, S. C., BARRY, G. F. & OLINS, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J Virol**, 67(8), 4566-4579.
- MAZZOLINI, G., NARVAIZA, I., PEREZ-DIEZ, A., RODRIGUEZ-CALVILLO, M., QIAN, C., SANGRO, B., RUIZ, J., PRIETO, J. & MELERO, I. (2001). Genetic heterogeneity in the toxicity to systemic adenoviral gene transfer of interleukin-12. **Gene Ther**, 8(4), 259-267.
- MEAD, G. P., RATCLIFFE, N. A. & RENWRANTZ, L. R. (1986). The separation of insect haemocyte types on Percoll gradients; methodology and problems. **Journal of Insect Physiology**, 32(2), 167-177.
- MEHROTRA, P. T., GRANT, A. J. & SIEGEL, J. P. (1995). Synergistic effects of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. **J Immunol**, 154(10), 5093-5102.
- MORGAN, D. A., RUSCETTI, F. W. & GALLO, R. (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**, 193(4257), 1007-1008.
- NASTALA, C. L., EDINGTON, H. D., MCKINNEY, T. G., TAHARA, H., NALESNIK, M. A., BRUNDA, M. J., GATELY, M. K., WOLF, S. F., SCHREIBER, R. D., STORKUS, W. J. & ET AL. (1994). Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. **J Immunol**, 153(4), 1697-1706.
- O'REILLY, D. R., MILLER, L. K. & LUCKOW, V. A. (1994). **Baculovirus expression vectors : a laboratory manual**, 4 edition: Oxford University Press.
- OKANO, F., SATOH, M. & YAMADA, K. (1997). Cloning and expression of the cDNA for canine interleukin-12. **J Interferon Cytokine Res**, 17(11), 713-718.
- OLFERT, E. D., CROSS, B. M. & MACWILLIAN, A. A. (1993). **Guide to the care and use of experimental animals.**, 2nd edition. Ottawa, Ont.: Canadian Council on Animal Care.
- ORTALDO, J. R., WINKLER-PICKETT, R. T., BERE, E. W., JR., WATANABE, M., MURPHY, W. J. & WILTROUT, R. H. (2005). In Vivo Hydrodynamic Delivery of cDNA Encoding IL-2: Rapid, Sustained Redistribution, Activation of Mouse NK Cells, and Therapeutic Potential in the Absence of NKT Cells. **J Immunol**, 175(2), 693-699.
- PAVLIN, D., TOZON, N., SERSA, G., POGACNIK, A. & CEMAZAR, M. (2008). Efficient electrotransfection into canine muscle. **Technol Cancer Res Treat**, 7(1), 45-54.

- PEREIRA, A. M. (2006). Ativação de células mononucleares caninas por Interleucina-2 e Interleucina-12 recombinantes homólogas., Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia.
- PINELLI, E., BOOG, C. J., RUTTEN, V. P., VAN DIJK, B., BERNADINA, W. E. & RUITENBERG, E. J. (1994a). A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. **Tissue Antigens**, 43(3), 189-192.
- PINELLI, E., GONZALO, R. M., BOOG, C. J., RUTTEN, V. P., GEBHARD, D., DEL REAL, G. & RUITENBERG, E. J. (1995). *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur J Immunol**, 25(6), 1594-1600.
- PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL REAL, G. & RUITENBERG, J. (1994b). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**, 62(1), 229-235.
- PINHEIRO, C. G. M. (2007). Resposta imune em camundongos BALB/c a um antígeno recombinante de *Leishmania chagasi*, saponina e interleucina-12 (IL-12). Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia.
- PODLASKI, F. J., NANDURI, V. B., HULMES, J. D., PAN, Y. C., LEVIN, W., DANHO, W., CHIZZONITE, R., GATELY, M. K. & STERN, A. S. (1992). Molecular characterization of interleukin 12. **Arch Biochem Biophys**, 294(1), 230-237.
- QUEZADA, A., HORNER, M. J., LOERA, D., FRENCH, M., PERICLE, F., JOHNSON, R., PERRARD, J., JENKINS, M. & COLEMAN, M. (2002). Safety toxicity study of plasmid-based IL-12 therapy in *Cynomolgus* monkeys. **J Pharm Pharmacol**, 54(2), 241-248.
- RHALEM, A., SAHIBI, H., GUESSOUS-IDRISSI, N., LASRI, S., NATAMI, A., RIYAD, M. & BERRAG, B. (1999). Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet Parasitol**, 81(3), 173-184.
- ROBB, R. J., MUNCK, A. & SMITH, K. A. (1981). T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. **J Exp Med**, 154(5), 1455-1474.
- ROSENBERG, S. A., LOTZE, M. T., MUUL, L. M., CHANG, A. E., AVIS, F. P., LEITMAN, S., LINEHAN, W. M., ROBERTSON, C. N., LEE, R. E., RUBIN, J. T. & ET AL. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. **N Engl J Med**, 316(15), 889-897.

- SALDARRIAGA, O. A., TRAVI, B. L., PARK, W., PEREZ, L. E. & MELBY, P. C. (2006). Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. **Vaccine**, 24(11), 1928-1940.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. (2001). **Molecular Cloning - a Laboratory Manual**, 3 edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANTOS, P. O. M. (2007). Avaliação da resposta imune em cães após imunização com dois antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi/infantum* em associação a interleucina-12 (IL-12) canina., Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia.
- SCHOENHAUT, D. S., CHUA, A. O., WOLITZKY, A. G., QUINN, P. M., DWYER, C. M., MCCOMAS, W., FAMILLETTI, P. C., GATELY, M. K. & GUBLER, U. (1992). Cloning and expression of murine IL-12. **J Immunol**, 148(11), 3433-3440.
- SLOVAK, M. & REPKA, V. (1993). Purification and characterization of storage protein from the haemolymph of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology**, 90(2), 123-135.
- SMITH, K. A., BAKER, P. E., GILLIS, S. & RUSCETTI, F. W. (1980). Functional and molecular characteristics of T-cell growth factor. **Mol Immunol**, 17(5), 579-589.
- STERN, A. S., PODLASKI, F. J., HULMES, J. D., PAN, Y. C., QUINN, P. M., WOLITZKY, A. G., FAMILLETTI, P. C., STREMLLO, D. L., TRUITT, T., CHIZZONITE, R. & ET AL. (1990). Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87(17), 6808-6812.
- STOBIE, L., GURUNATHAN, S., PRUSSIN, C., SACKS, D. L., GLAICHENHAUS, N., WU, C. Y. & SEDER, R. A. (2000). The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97(15), 8427-8432.
- TANIGUCHI, T., MATSUI, H., FUJITA, T., TAKAOKA, C., KASHIMA, N., YOSHIMOTO, R. & HAMURO, J. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature**, 302(5906), 305-310.
- TEWARY, P., SAXENA, S. & MADHUBALA, R. (2006). Co-administration of IL-12 DNA with rORFF antigen confers long-term protective immunity against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, 24(13), 2409-2416.
- TOJO, S., MARUTA, K. & YOSHIGA, T. (1997). Developmental changes of storage proteins and biliverdin-binding proteins in the haemolymph and fat body of the common cutworm, *Spodoptera litura*. **J Insect Physiol**, 44(1), 67-76.

- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76(9), 4350-4354.
- TRINCHIERI, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, 3(2), 133-146.
- WATFORD, W. T., MORIGUCHI, M., MORINOBU, A. & O'SHEA, J. J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev**, 14(5), 361-368.
- WATSON, J., GILLIS, S., MARBROOK, J., MOCHIZUKI, D. & SMITH, K. A. (1979). Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. I. Purification of a class of murine lymphokines. **J Exp Med**, 150(4), 849-861.
- WHITFORD, M., STEWART, S., KUZIO, J. & FAULKNER, P. (1989). Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. **J Virol**, 63(3), 1393-1399.
- WOLF, S. F., TEMPLE, P. A., KOBAYASHI, M., YOUNG, D., DICIG, M., LOWE, L., DZIALO, R., FITZ, L., FERENZ, C., HEWICK, R. M. & ET AL. (1991). Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **J Immunol**, 146(9), 3074-3081.
- WU, X., YIN, Z., CAO, C., HUANG, L., LU, X., LIU, J. & CUI, W. (2004). Expression of human VEGF165 in silkworm (*Bombyx mori* L.) by using a recombinant baculovirus and its bioactivity assay. **J Biotechnol**, 111(3), 253-261.
- YAMAKAMI, K., AKAO, S., SATO, M., NITTA, Y., MIYAZAKI, J. & TADAKUMA, T. (2001). A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid expressing interleukin-12 protects BALB/c mice from *Leishmania major* infection. **Parasitol Int**, 50(2), 81-91.
- YE, J., ORTALDO, J. R., CONLON, K., WINKLER-PICKETT, R. & YOUNG, H. A. (1995). Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. **J Leukoc Biol**, 58(2), 225-233.