


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**Construção e avaliação funcional de um plasmídeo terapêutico para expressão da Interleucina 10 (IL-10) de *Mus musculus* em células mamíferas, utilizando como veículo carreador linhagens de *Lactococcus lactis* invasivas: desenvolvimento de uma estratégia alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais**

**Aluna:** Fernanda Alvarenga Lima Barroso  
**Orientador:** Prof. Dr. Anderson Miyoshi  
**Co-Orientadora:** Dra. Sophie Leclercq

Fernanda Alvarenga Lima Barroso



**Construção e avaliação funcional de um plasmídeo terapêutico para expressão da Interleucina 10 (IL-10) de *Mus musculus* em células mamíferas, utilizando como veículo carreador linhagens de *Lactococcus lactis* invasivas: desenvolvimento de uma estratégia alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética

**Área de Concentração:** Genética Molecular, de Microrganismos e Biotecnologia

**Orientador:** Prof. Dr. Anderson Miyoshi  
**Co-Orientadora:** Dra. Sophie Leclercq

Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2012

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”  
Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

- A Deus toda glória! Tudo o que sou e o que vier a ser eu ofereço a Deus!
- Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson Miyoshi que abriu as portas para mim e que durante todos esses anos tem sido um grande mestre em minha vida. Obrigada mais uma vez por acreditar no meu trabalho, pela confiança em mim depositada e pela valiosa orientação.
- Ao Prof. Dr. Vasco Azevedo pelo incentivo e pela força constantes.
- À pesquisadora Dra. Sophie Leclercq pela co-orientação e apoio nos experimentos.
- À Dr<sup>a</sup>. Janete Santos pela inestimável ajuda, bons conselhos, prontidão e boa vontade, muito obrigada!
- Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e pela disponibilidade em avaliarem este trabalho.
- À Pós-graduação em Genética, incluindo seus professores, alunos e funcionários.
- A todos os colegas do LGCM por terem contribuído para essa conquista.
- Ao grupo de Bactérias Lácticas, em especial às amigas:
  - o Meritxell Zurita Turk pela companhia duante todo o mestrado e em todos os experimentos. Pelo carinho, amizade, aprendizado e otimismo inabalável que fizeram esse projeto dar certo!
  - o Camila Prósperi por ter paciência comigo quando eu a ensinava e mais paciência ainda quando precisava me ensinar!
  - o Pamela Mancha Agresti por me mostrar que brasileiros e argentinos podem ser grandes amigos! Obrigada pela amizade, carinho e cuidado!Meninas vocês tornarem essa caminhada mais fácil, alegre e especial. Vocês são parte deste trabalho e da minha vida!
- Ao meu esposo Gê que sempre acreditou em mim, mais do que eu mesma poderia acreditar! Obrigada por ser o melhor companheiro e amigo. Sem você nada disso seria possível!
- Aos meus amigos e familiares pelo amor e apoio incondicionais!
- Mais uma vez, obrigada a todos!!!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
1. APRESENTAÇÃO .....	15
1.1 Colaborações.....	15
1.2 Introdução geral.....	15
1.3 Estrutura do Manuscrito.....	17
2. INTRODUÇÃO .....	19
2.1 A mucosa intestinal.....	19
2.2 As doenças inflamatórias do trato gastrointestinal .....	23
2.2.1 Modelos murinos de doenças inflamatórias intestinais .....	24
2.3 A Interleucina 10.....	25
2.4 Intervenções imunoterapêuticas utilizando a IL-10 .....	26
2.5 Bactérias como veículos de entrega.....	27
2.5.1 Bactérias Lácticas.....	29
2.6 <i>Lactococcus lactis</i> .....	30
2.6.1 <i>L. lactis</i> como vacinas vivas de mucosas .....	31
2.6.2 <i>Lactococcus lactis</i> secretoras da IL-10.....	32
2.7 <i>Lactococcus lactis</i> como carreador de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos .....	33
3. OBJETIVOS .....	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2 Objetivos Específicos .....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem. ....	39
4.2 Manipulação do DNA.....	41
4.3 Resolução Eletroforética.....	42
4.4 Clonagem da ORF IL-10 no sistema TOPO .....	42
4.4.1 Produção de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetente.....	42
4.4.2 Amplificação da ORF IL-10.....	43
4.4.3 Ligação da ORF IL-10 no vetor Zero Blunt® TOPO® e transformação em <i>E. coli</i> .....	44
4.4.4 Extração do DNA plasmidiano de <i>E. coli</i> .....	45
4.4.5 Confirmação da presença e do peso molecular do inserto IL-10 clonado no vetor TOPO.....	46
4.5 Construção do plasmídeo pValac::IL-10.....	47
4.5.1 Extração do plasmídeo pValac::gfp .....	47
4.5.2 Digestão enzimática do plasmídeo pValac::gfp.....	48
4.5.3 Purificação do fragmento de DNA correspondente ao plasmídeo pValac desprovido da ORF gfp.....	48
4.5.4 Digestão enzimática do pTOPO::IL-10 e purificação da ORF IL-10.....	48
4.5.5 Ligação da ORF IL-10 no vetor pValac .....	49
4.5.6 Transformação de <i>E. coli</i> TG1 com o plasmídeo pValac::IL-10 .....	49
4.5.7 Confirmação da presença do inserto IL-10 no vetor pValac.....	49

4.6 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::IL-10 em cultura de células mamíferas.....	51
4.6.1 Cultura de Células CHO .....	51
4.6.2 Obtenção do DNA para transfecção.....	52
4.6.3 Padronização da transfecção de células mamíferas com o plasmídeo pValac::gfp utilizando Lipofectamine™ 2000 .....	52
4.6.4 Transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac::IL-10 .....	53
4.6.5 Extração de proteínas das células transfectadas .....	53
4.7 Verificação da produção, por células da linhagem CHO, da proteína IL-10.....	54
4.7.1 Western Blotting .....	54
4.7.1.1 Resolução eletroforética das proteínas em gel SDS-PAGE .....	54
4.7.1.2 Visualização dos extratos protéicos por Nitrato de Prata .....	54
4.7.1.3 Western Blotting .....	55
4.7.2 Ensaio imunoenzimático .....	56
4.7.3 Imunocitoquímica - Marcação com Alexa Fluor 488.....	56
4.7.4 Ensaio de citometria de Fluxo .....	57
4.8 Construção de linhagens de <i>Lactococcus lactis</i> carreadoras do plasmídeo pValac::IL-10.....	58
4.8.1 Confeção de células eletrocompetentes de <i>L. lactis</i> .....	58
4.8.2 Transformação das linhagens de <i>L. lactis</i> com o plasmídeo pValac::IL-10.....	59
4.8.3 Extração do DNA plasmidiano de <i>L. lactis</i> .....	60
4.8.4 Confirmação das construções <i>L. lactis</i> (pValac::IL-10) .....	60
4.9 Ensaio-piloto em camundongos com IBD experimental.....	62
4.9.1 Indução da IBD experimental .....	62
4.9.1.2 Administração de linhagens de <i>L. lactis</i> recombinantes .....	62
4.9.1.2.1 Tratamento da IBD experimental .....	62
4.9.2 Aspectos bioéticos e de biossegurança .....	63
4.9.2.1 Bioética .....	63
4.9.2.2 Biossegurança .....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1 Construção do plasmídeo pValac::IL-10.....	66
5.1.1 Amplificação da ORF IL-10.....	66
5.1.2 Clonagem da ORF IL-10 no sistema TOPO .....	67
5.1.3 Clonagem da ORF IL-10 no vetor pValac.....	68
5.2 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::IL-10 em cultura de células.....	70
5.2.1 Transfecção de células da linhagem Flp-In™-CHO .....	70
5.2.2 Padronização da transfecção celular com o plasmídeo pValac::gfp .....	71
5.2.3 Verificação da produção de IL-10 por Western Blotting .....	72
5.2.4 Verificação da produção de IL-10 por Ensaio imunoenzimático – ELISA ...	73
5.2.5 Verificação da produção de IL-10 por Imunocitoquímica - Marcação com Alexa 488.....	73
5.2.6 Verificação da produção de IL-10 por Ensaio de citometria de Fluxo – FACS76	
5.3 Construção de linhagens de <i>L. lactis</i> carreadoras do plasmídeo pValac::IL-10.....	79
5.3.1 Obtenção das linhagens <i>L. lactis</i> pValac::IL-10.....	79
5.3.2 Confirmação das construções <i>L. lactis</i> pValac::IL-10.....	79
5.4 Ensaio-piloto em camundongos com IBD experimental induzida por DSS.....	81
5.4.1 Avaliação do efeito terapêutico do plasmídeo pValac::IL-10.....	81
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	86
6.1 Conclusões .....	86
6.2 Perspectivas .....	86
6.2.1 Ensaio-piloto em camundongos com IBD experimental induzida por DSS ..	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	89

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismos que limitam as interações bactérias-células epiteliais (IECs).	20
<b>Figura 2:</b> Mecanismos de transporte através do epitélio intestinal.....	21
<b>Figura 3:</b> Colapso da homeostase da mucosa. ....	23
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da transferência de plasmídeos de DNA às células mamíferas mediada por bactérias. ....	28
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do vetor de expressão eucariótica pValac (Vaccination using Lactic acid bacteria). ....	40
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática do vetor Zero Blunt® TOPO®, destacando-se o sítio de clonagem múltipla.....	45
<b>Figura 7:</b> Amplificação, por PCR, da ORF IL-10 de <i>Mus musculus</i> . ....	66
<b>Figura 8:</b> Amplificação, por PCR, da ORF IL-10 de <i>M. musculus</i> e digestão enzimática a partir do DNA plasmidiano extraído de células de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pTOPO::IL-10. ....	68
<b>Figura 9:</b> Análise do produto de digestão enzimática do pValac::gfp.....	68
<b>Figura 10:</b> Análise dos produtos IL-10 e pValac purificados.. ....	69
<b>Figura 11:</b> Confirmação da presença, por PCR, da ORF IL-10 no vetor pValac.....	70
<b>Figura 12:</b> Mecanismo proposto para entrada do DNA nas células.. ....	71
<b>Figura 13:</b> Padronização da transfecção das células Flp-InTM-CHO (Invitrogen) com o plasmídeo pValac::gfp. ....	72
<b>Figura 14:</b> Análise do extrato protéico de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10 corado com Nitrato de Prata. ....	73
<b>Figura 15:</b> Verificação da produção de IL-10 por Imunocitoquímica utilizando Microscopia Confocal.. ....	74
<b>Figura 16:</b> Verificação da produção de IL-10 por Imunocitoquímica utilizando Microscopia Confocal em plano com zoom. ....	74
<b>Figura 17:</b> Controle negativo do anticorpo secundário Alexa Fluor 488.....	75
<b>Figura 18:</b> Controles negativos.....	75
<b>Figura 19:</b> Verificação da produção de GFP por Imunocitoquímica utilizando Microscopia Confocal. ....	76
<b>Figura 20:</b> Detecção da produção da proteína verde fluorescente (GFP) por células CHO. ....	77

<b>Figura 21:</b> Detecção da produção da proteína verde fluorescente (GFP) por células CHO. .....	78
<b>Figura 22:</b> Detecção da produção de IL-10 por células CHO.....	78
<b>Figura 23:</b> Detecção da produção de IL-10 por células CHO.....	79
<b>Figura 24:</b> Confirmação da construção da linhagem de <i>L. lactis</i> MG1363 (pValac::IL-10).. .....	80
<b>Figura 25:</b> Confirmação da construção da linhagem de <i>L. lactis</i> MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10). .....	81



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.....	39
<b>Tabela 2:</b> Primers que foram utilizados para a amplificação, por PCR, da ORF IL-10.	43
<b>Tabela 3:</b> Condições de amplificação, por PCR, da ORF IL-10 .....	44
<b>Tabela 4:</b> Condições de amplificação por PCR .....	47
<b>Tabela 5:</b> Primers correspondentes ao vetor pValac que foram utilizados na confirmação, por PCR, da construção pValac::IL-10 .....	50
<b>Tabela 6:</b> Condições da reação de PCR para confirmação da construção pValac::IL-1050	
<b>Tabela 7:</b> Primers utilizados na reação de PCR da ORF <i>IL-10</i> , <i>gfp</i> e de parte da ORF <i>FnBPA</i> .....	61
<b>Tabela 8:</b> Condições de PCR para confirmação dos clones de <i>L. lactis</i> portadores do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10 .....	62
<b>Tabela 9:</b> Análises macroscópicas dos animais do Grupo 1 - FnBPA.....	82
<b>Tabela 10:</b> Análises macroscópicas dos animais do Grupo 2 – FnBPA (pValac::IL-10)	82
<b>Tabela 11:</b> Análises macroscópicas dos animais do Grupo 3 – MG1363 .....	82
<b>Tabela 12:</b> Análises macroscópicas dos animais do Grupo 4– MG1363 (pValac::IL-10)	83
<b>Tabela 13:</b> Análises macroscópicas dos animais do Grupo 5 – DSS + Meio.....	83
<b>Tabela 14:</b> Análises macroscópicas dos animais do Grupo6 – Controle.....	84
<b>Tabela 15:</b> Índice microscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos .	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

Amp – Ampicilina

APC – do inglês: Antigen Presenting Cells; Células Apresentadoras de Antígenos

BGH poli-A – do inglês: Bovine Growth Hormone Polyadenylation signal; Sequência Sinal de Poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento

BL – Bactérias Lácticas

BLG –  $\beta$ -Lactoglobulina Bovina

BSA – do inglês: Bovine Serum Albumin; Albumina de Soro Bovino

CD – do inglês: Crohn's Disease; Doença de Crohn

cDNA – DNA complementar

CHO – do inglês: Chinese Hamster Ovary cell strain; Células da linhagem de Ovário de Hamster Chinês

Cm – Clorafenicol

CMV – Citomegalovirus

CSIF – do inglês: Cytokine Synthesis Inhibitor Factor; Fator Inibidor da Síntese de Citocinas

DAPI – 4,6'-diamidino-2-fenilindole

DC – do inglês: Dendritic Cells; Células Dendríticas

DMSO – do inglês: Dimethyl Sulfoxide; Sulfóxido de Dimetilo

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxinucleotídeo trifosfato

DO – Densidade óptica

DSS – do inglês: Dextran Sulphate Sodium; Sulfato de sódio dextrano

EDTA – Etileno diamino tetra acetato dissódico

ELISA – do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima

Ery – Eritromicina

FACS – do inglês: Fluorescent Activated Cell Sorter; Separação de Células Ativadas por Fluorescência

FnBPA – do inglês: Fibronectin Binding Protein A of *Staphylococcus aureus*; Proteína de ligação da Fibronectina A de *Staphylococcus aureus*

GALT – do inglês: Gut-Associated Lymphoid Tissue; Tecido Linfóide Associado ao intestino

GFP – do inglês: Green Fluorescent Protein; Proteína Verde Fluorescente

GRAS – do inglês: Generally Regarded As Safe; Geralmente reconhecido como seguro

hIL-10 – do inglês: Human Interleukin-10; Interleucina 10 Humana

IBD – do inglês: Inflammatory Bowel Disease; Doença Inflamatória Intestinal

IEC – do inglês: Intestinal Epithelial Cell; Célula Epitelial Intestinal

IEL – do inglês: Intraepithelial Lymphocytes; Linfócitos Intraepiteliais  
IgA – Imunoglobulina do tipo A  
IgG – Imunoglobulina do tipo G  
IgE – Imunoglobulina do tipo E  
IL-10 – Interleucina 10  
IL-10 -/- – Modelo murino IL-10 “*knockout*”  
Kb – Quilobases ( $10^3$  pb)  
KDa – Quilodaltons ( $10^3$  Da)  
Km – Canamicina  
L – Litro  
LB – Meio de cultura Luria-Bertani  
LMs – Linfonodos Mesentéricos  
LP – Lâmina Própria  
LPS – Lipopolissacarídeos  
 $\mu$ g – Micrograma  
 $\mu$ F - Microfarad (capacitância)  
 $\mu$ L – Microlitro  
 $\mu$ M – Micromolar  
M – Molar  
mA – Miliampere (Amperagem)  
MAMPs – do inglês: Microbe Associated Molecular Patterns; Padrões Moleculares Associados à Micróbios  
mg – Miligrama  
mIL-10 – do inglês: Mouse Interleukin-10; Interleucina 10 Murina  
mL – Mililitro  
mM – Milimolar  
M17-Gli – Meio de cultura M17 Glicose  
M17- Sac-Gli– Meio de cultura M17 Glicose Sacarose  
ng – Nanogramas  
NLRs – do inglês: NOD-like Receptors; Receptores NOD-like  
OGM – Organismo Geneticamente Modificado  
ORF – do inglês: Open Reading Frame; Fase de Leitura  
PAMPs – do inglês: Pathogen Associated Molecular Patterns; Padrões Moleculares Associados à Patógenos  
pb – Pares de Base  
PBS – do inglês: Phosphate Buffered Saline; Tampão Fosfato Salina  
pCMV – Promotor do Citomegalovírus

PCR – do inglês: Polymerase Chain Reaction; Reação em Cadeia da Polimerase  
PEG3000 – Polietileno glicol 3000  
PP – Placas de Peyer  
PRR – do inglês: Pattern Recognition Receptor; Receptores de Reconhecimento de Padrões  
PVDF – do inglês: Polyvinylidene fluoride; Fluoreto de Polivinilideno  
q.s.p. – Quantidade suficiente para  
rIL-10 – Proteína IL-10 Recombinante  
rhIL-10 – Proteína IL-10 Humana Recombinante  
RBS – do inglês: Ribosome Binding Site; Sítio de ligação do Ribossomo  
RNA – Ácido Ribonucléico  
Rnase – Ribonuclease A  
rpm – Rotações por minuto  
SDS-PAGE – do inglês: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis;  
Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida  
SED – do inglês: Subepithelial Dome; Cúpula subepitelial  
sIgA - Imunoglobulina A secretória  
SP – Peptídeo Sinal  
TE-LYS – TE-Lisozima  
TGI – Trato Gastrointestinal  
TLRs – do inglês: Toll-like Receptors; Receptores Toll-like  
TNBS – do inglês: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid; Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico  
Tris – Tris-hidroximetilaminometano  
TTFC – Fragmento C da Toxina Tetânica  
UC – do inglês: Ulcerative Colitis; Colite Ulcerativa  
UFC – Unidades Formadores de Colônia  
V – Volts  
W - Wats  
 $\Omega$  – Ohm (resistência)

## RESUMO

As superfícies de mucosa são os principais sítios de interação entre o corpo e o meio externo constituindo uma das primeiras linhas de defesa do organismo, sendo consideradas um alvo atraente para a entrega de drogas biológicas. Por isso, nas últimas décadas o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para entrega de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos às mucosas tem recebido considerável atenção. Assim, o uso de bactérias carreadoras desses plasmídeos, pela rota oral, constitui uma estratégia promissora. Para tanto, a utilização de bactérias não patogênicas como as Bactérias Lácticas (BL), constitui uma opção segura para este propósito. *Lactococcus lactis* é a BL modelo e vem sendo muito utilizada para a produção e entrega de antígenos e citocinas ao nível de mucosas. Neste contexto, com o objetivo de otimizar a entrega de plasmídeos para células epiteliais humanas, foram construídas linhagens de *L. lactis* invasivas e também um plasmídeo replicativo em *L. lactis*, contendo um cassete de expressão eucariótica denominado pValac. Assim, a utilização da linhagem invasiva de *L. lactis* capaz de entregar o vetor pValac codificando a Interleucina 10 (IL-10) de *Mus musculus*, uma potente citocina anti-inflamatória, poderia representar uma nova estratégia para o tratamento de doenças inflamatórias como as doenças inflamatórias intestinais (IBDs). Assim, este trabalho teve como objetivo construir o plasmídeo terapêutico pValac::IL-10 e verificar a sua funcionalidade, *in vitro*, assim como a clonagem deste plasmídeo em uma linhagem invasiva de *L. lactis*, visando o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e mais eficaz contra as IBDs. A sequência codificadora da IL-10 foi obtida a partir de um plasmídeo sintético contendo a ORF da IL-10 de *M. musculus* e clonada no vetor Zero Blunt® TOPO® e subclonada no vetor pValac. Para avaliação da funcionalidade do plasmídeo pValac::IL-10, células da linhagem CHO (Chinese Hamster Ovary) foram transfectadas com o plasmídeo construído e a expressão da IL-10 por essas células foi avaliada por ELISA, Western Blot, Microscopia Confocal e FACS. Por fim, o plasmídeo pValac::IL-10 foi transformado na linhagem invasiva de *L. lactis* e a mesma foi então utilizada em um ensaio piloto, *in vivo*, para avaliar a capacidade terapêutica e imunomoduladora em camundongos com IBD experimental. Enfim, este trabalho constitui um primeiro passo rumo ao desenvolvimento de uma nova estratégia para o controle de doenças inflamatórias além da validação da eficácia e efetividade da linhagem invasiva de *L. lactis* como veículo para novas terapias e vacinas de DNA.

## ABSTRACT

Mucosal surfaces are the principal sites of interaction between the body and the external environment, constituting one of the first lines of defense of an organism, and as such, are considered to be an attractive target for the delivery of biological drugs. In this regard, special attention has been given, in the last decades, to the development of more efficient strategies for delivery of vaccine and/or therapeutic plasmids to the mucosa. The use of bacteria carrying these plasmids, by oral route, constitutes a promising strategy; hereupon, the use of non pathogenic bacteria, such as Lactic Acid Bacteria (LAB), constitutes a safe choice for such purposes. *Lactococcus lactis* is the LAB model and has been extensively used for the production and delivery of antigens and cytokines to the mucosal level. In this context, with the goal of optimizing plasmid delivery to human epithelial cells, invasive strains of *L. lactis* as well as a replicative plasmid in *L. lactis*, containing a eukaryotic expression cassette called pValac were constructed. Thus, the use of the invasive *L. lactis* strain capable of delivering the pValac vector coding for Interleukin 10 (IL-10) of *Mus musculus*, a powerful anti-inflammatory cytokine, could represent a new strategy for the treatment of inflammatory diseases such as inflammatory bowel diseases (IBDs). So, the goal of this project is to construct a therapeutic plasmid, pValac::IL-10, and verify its functionality *in vitro*, as well as its cloning into the invasive *L. lactis* strain, aiming at developing an alternative and more efficient therapeutic treatment against IBDs. The coding sequence of IL-10 was obtained from a synthetic plasmid containing the ORF of IL-10 from *M. musculus*, which was first cloned into the Zero Blunt® TOPO® and subsequently into the pValac vector. To evaluate the functionality of the pValac::IL-10 plasmid, cells of the CHO (Chinese Hamster Ovary) cell line were transfected with the constructed plasmid and expression of IL-10 by these cells was evaluated by ELISA, Western Blot, Confocal Microscopy and FACS. The pValac::IL-10 plasmid was finally transformed into the invasive *L. lactis* strain and the same was then used in an *in vivo* pilot trial to evaluate its therapeutic and immunomodulatory capacity in mice with experimental IBD. Ultimately, this work constitutes a first step towards the development of a new strategy to control inflammatory diseases, besides validating the efficiency and effectiveness of the invasive strain of *L. lactis* as vehicle for new DNA therapies and vaccines.

## **1. APRESENTAÇÃO**

## 1. APRESENTAÇÃO

### 1.1 Colaborações

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de uma colaboração entre o Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e o Laboratório de Inovação Biotecnológica (LIB) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Esta colaboração se deu devido ao interesse mútuo dos laboratórios, acima citados, em promover o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas e terapêuticas para as bactérias lácticas. Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Professor Doutor Anderson Miyoshi (LGCM – UFMG) e a co-orientação da Doutora Sophie Leclercq (LIB – FUNED), e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### 1.2 Introdução geral

As superfícies da mucosa recobrem os tratos gastrointestinais, respiratórios e urogenitais e representam os sítios de interação principal entre o corpo e o meio externo, sendo consideradas uma das primeiras linhas de defesa do organismo e por isso um alvo atraente para a entrega de drogas biológicas visando regular o delicado equilíbrio entre o controle de infecções e prevenção de doenças inflamatórias. Assim, o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para entrega de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos aos tecidos da mucosa tem recebido atenção considerável nas últimas décadas. Neste contexto, a utilização de bactérias como veículo para a entrega de plasmídeos pela rota oral constitui uma estratégia de vacinação promissora (Schoen *et al.*, 2004). Bactérias patogênicas atenuadas, tais como *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella thiphymurium*, vêm sendo utilizadas atualmente para tais fins (Daudel *et al.*, 2007). Após essas bactérias invadirem as células epiteliais e serem fagocitadas, o plasmídeo consegue escapar da vesícula e alcançar o núcleo da célula hospedeira, resultando na expressão da ORF (do inglês, Open Reading Frame) e posterior apresentação da molécula de interesse (Grillot-Courvalin *et al.*, 1999). Contudo, estas bactérias apresentem risco de reversão ao fenótipo selvagem não sendo totalmente seguras para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002).

Neste contexto, a utilização de bactérias não patogênicas e comensais, tal como as Bactérias Lácticas (BL), poderia constituir uma alternativa mais atraente e segura para entrega de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos (Wells e Mercenier, 2008). As BL



compõem um grupo bastante heterogêneo de microrganismos Gram-positivos capazes de converter açúcares em ácido láctico e que são utilizados há séculos em processos de fermentação e preservação de alimentos, sendo considerados seguros para uso humano. *Lactococcus lactis*, uma das BL mais bem estudadas, figura como microrganismo modelo no estudo das mesmas e vem sendo extensivamente utilizada para a produção e entrega de antígenos e citocinas ao nível de mucosas. Dessa maneira, o uso de linhagens geneticamente modificadas dessa bactéria também como veículos para a entrega de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos seria bastante promissor.

Neste contexto, uma linhagem recombinante de *L. lactis*, expressando a proteína de ligação Fibronectina A (FnBPA) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), foi construída e testada com o objetivo de melhorar e facilitar a entrega do DNA às células de mamíferos (Innocentin *et al.*, 2009). FnBPA é capaz de mediar a adesão da bactéria ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas (Sinha *et al.*, 2000). Foi demonstrado que *L. lactis* expressando FnBPA foi capaz de entregar um plasmídeo de expressão eucariótica funcional à linhagem celular Caco-2 (Innocentin *et al.*, 2009). Além disso, também foi construído um novo plasmídeo, denominado pValac (Vaccination using Lactic acid bactéria) a partir da fusão do i) promotor do citomegalovírus (pCMV), que permite a expressão do antígeno de interesse em células eucarióticas, ii) do sítio de clonagem múltipla, iii) da sequência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH poli-A), para estabilizar o transcrito do RNA mensageiro, iii) de origens de replicação, RepA e RepC, que permitem a propagação do plasmídeo tanto em *Escherichia coli* quanto em *L. lactis*, e iv) de um gene de resistência ao cloranfenicol, para a seleção das linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009).

Assim, a utilização desta linhagem invasiva, *L. lactis* MG1363 FnBPA+, capaz de entregar o vetor de expressão eucariótica pValac para expressão da Interleucina 10 (IL-10) de *Mus musculus*, uma potente citocina anti-inflamatória, poderia representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e mais eficaz contra as doenças inflamatórias intestinais (IBDs – do inglês, Inflammatory Bowel Diseases), tais como a Doença de Crohn e a Colite Ulcerativa.

As IBDs são doenças complexas crônicas caracterizadas por inflamação severa no trato gastrointestinal (TGI). A etiologia das IBDs não é totalmente conhecida, porém, é amplamente aceito que fatores genéticos, ambientais e imunogênicos estão envolvidos no seu desenvolvimento (Sartor, 2006; Sartor, 2008). Atualmente não existe cura e os tratamentos existentes para as IBDs têm como objetivo controlar e diminuir a inflamação, utilizando principalmente drogas corticosteróides, imunossupressores e antibióticos. Porém, os efeitos colaterais destes tratamentos e os seus efeitos terapêuticos moderados despertam para a necessidade do desenvolvimento de terapias mais duradouras e eficazes.

A Interleucina-10 (IL-10) é uma das citocinas anti-inflamatórias mais importantes da resposta imune (Asadullah, 2003). Ela é secretada tanto por células do sistema imune adaptativo quanto do inato, e desta maneira apresenta um papel crucial como regulador de diversas respostas imunológicas. Por desempenhar um papel central na regulação negativa da cascata inflamatória, suprimindo a secreção de citocinas pro-inflamatórias e simultaneamente aumentando a produção de mediadores anti-inflamatórios, a IL-10 se apresenta como uma forte candidata para uso em intervenções terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias (Steidler *et al.*, 2000), tais como as IBDs e diversas alergias.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo a construção do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10 e verificação de sua funcionalidade, *in vitro*, em células mamíferas, e também a clonagem deste plasmídeo na linhagem invasiva de *L. lactis* para sua avaliação como uma nova estratégia terapêutica para o tratamento e prevenção das IBDs.

Assim, este trabalho representa um primeiro passo rumo ao desenvolvimento de uma nova estratégia com potenciais aplicações para o tratamento das IBDs. Além do mais, esta estratégia combina as vantagens da imunidade de mucosas, visando a modulação da resposta imune no trato gastrointestinal, a segurança da utilização de bactérias não patogênicas com a simplicidade da técnica e o baixo custo da terapia utilizando DNA.

### 1.3 Estrutura do Manuscrito

Este manuscrito apresenta, em sua primeira seção, uma introdução geral seguida de uma revisão da literatura a qual aborda os seguintes assuntos principais: (i) a mucosa intestinal; (ii) as doenças inflamatórias do trato gastrointestinal; (iii) a Interleucina 10; (iv) as Bactérias Lácticas como veículos para entrega de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos e (v) a utilização de linhagens de *Lactococcus lactis* para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais. Em seguida, encontram-se os objetivos do trabalho e a metodologia utilizada para o desenvolvimento do mesmo. A seguir, os resultados serão apresentados e discutidos, divididos em quatro partes: (i) a construção do plasmídeo pValac::IL-10; (ii) a verificação da funcionalidade do pValac::IL-10; (iii) a construção da linhagem invasiva de *L. lactis* FnBPA contendo o plasmídeo pValac::IL-10 e (iv) realização do ensaio - piloto para avaliação, *in vivo*, do efeito terapêutico do pValac::IL-10 em modelo murino de colite induzido por DSS. Por fim, as conclusões e as perspectivas do presente trabalho serão explanadas, seguindo-se as Referências Bibliográficas.

## **2. INTRODUÇÃO**

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 A mucosa intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) humano é colonizado por até  $10^{14}$  bactérias, dez vezes mais do que o número de células no corpo humano (Artis, 2008, Ley *et al.*, 2006). Em condições normais, a microbiota intestinal vive em uma relação simbiótica com o hospedeiro (Neish, 2009), onde o hospedeiro fornece um habitat rico em nutrientes, enquanto as bactérias podem conferir funções essenciais e benefícios importantes ao hospedeiro.

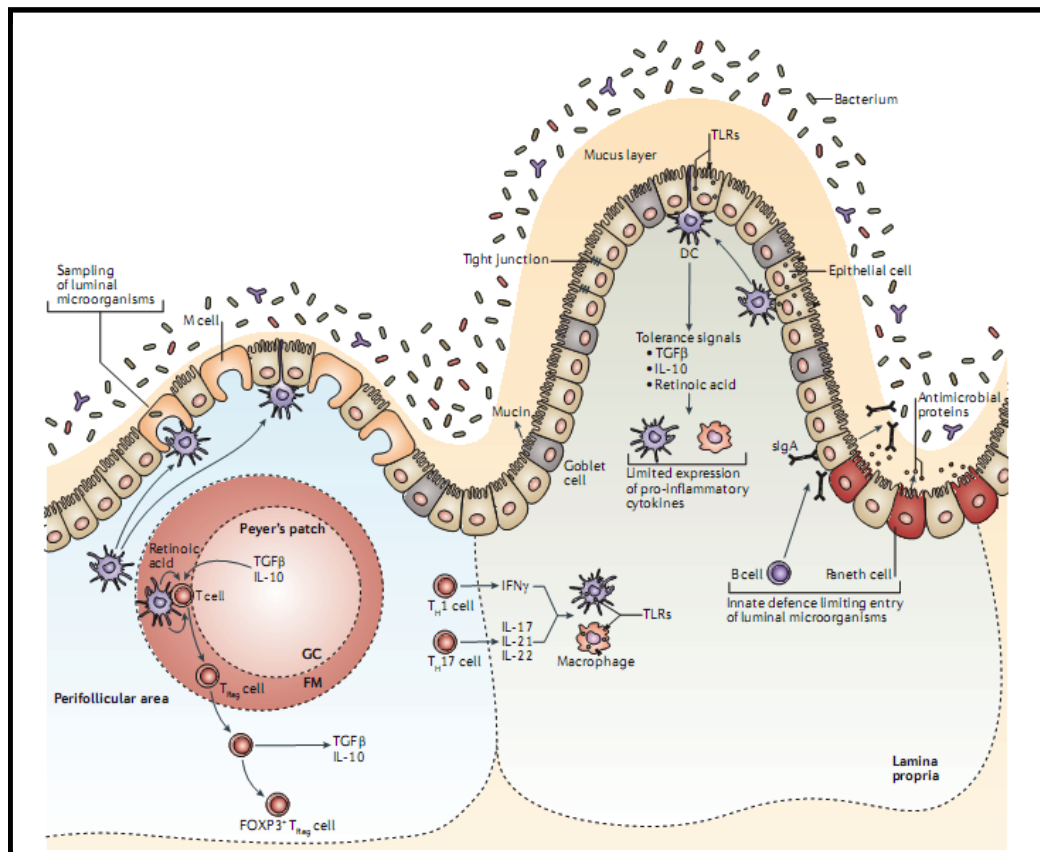
A microbiota intestinal é responsável por contribuições essenciais para a fisiologia e a saúde humana e é necessária para manter a homeostase intestinal e o seu funcionamento correto além de integrar vários processos, tais como a absorção e intercâmbio de nutrientes, formação e fortalecimento da barreira do epitélio intestinal e participação na proteção contra a colonização de patógenos (Bäckhed *et al.*, 2005; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

O epitélio intestinal cria uma barreira física entre o ambiente externo e interno e é o responsável pelo controle imunológico das bactérias comensais e as potencialmente patogênicas. A fim de manter a homeostase e evitar que o sistema imune reaja contra os antígenos exógenos inofensivos presentes no intestino, mesmo durante perturbações do ambiente, é preciso manter um equilíbrio entre a tolerância aos comensais e imunidade à patógenos, permitindo a homeostase intestinal entre o hospedeiro e os microrganismos que habitam nele. A homeostase intestinal surge a partir de um balanço dinâmico entre a imunidade protetora do hospedeiro e mecanismos regulatórios (Izcue *et al.*, 2009).

Um dos elementos essenciais para manter a homeostase com a microbiota é minimizar o contato entre os microrganismos luminiais e a superfície das células epiteliais do intestino (IEC - do inglês, intestinal epithelial cell), (Maloy and Powrie, 2000, Hill and Artis, 2010). Assim, IECs especializadas, as células caliciformes, produzem secreções ricas em mucinas fortemente glicosiladas que criam uma barreira de muco relativamente impermeável (Hill and Artis, 2010).

Por outro lado, junções fortes através das zonas de oclusão (“tight junctions”) presentes entre as IECs são capazes de restringir o tráfego paracelular, e extensões microvilares de actina criam uma borda em escova apical que dificulta a adesão e invasão microbiana (Izcue *et al.*, 2009). As IECs (incluindo as células de Paneth, as células caliciformes e os enterócitos) também secretam uma ampla gama de peptídeos antimicrobianos, incluindo defensinas, catelicidinas e lectinas do tipo C. A maioria destas moléculas são ricas em resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos que conferem propriedades antimicrobianas de largo espectro devido sua propensão para formar poros na membrana celular bacteriana (Sansone, 2004; Magalhaes *et al.*, 2007). Outro mecanismo

para sequestro de bactérias envolve a secreção de Imunoglobulina A (sIgA) a fim de limitar a associação bacteriana com a superfície das IECs e restringir a penetração bacteriana ao epitélio intestinal (Figura 1) (Hooper and Macpherson, 2010). Juntos, todos estes mecanismos fornecem um escudo físico e bioquímico a fim de evitar a invasão de microrganismos nas IECs.

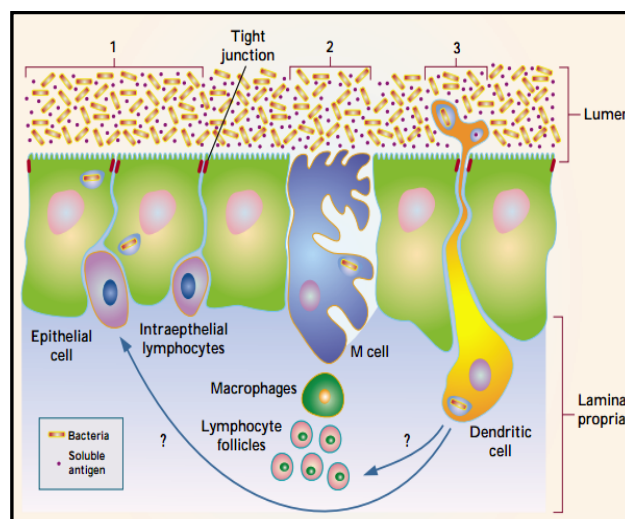


**Figura 1:** Mecanismos que limitam as interações bactérias-células epiteliais (IECs) (Bron *et al.*, 2011).

Além da sua função de barreira física, o epitélio do TGI faz parte do sistema imune do trato digestivo, o qual inclui as IECs e o tecido linfóide associado ao intestino (GALT - do inglês, Gut-Associated Lymphoid Tissue), o maior órgão imune do corpo humano (Neish, 2009; Sansonetti, 2004). O GALT é composto por dois compartimentos funcionais, um braço aferente, as Placas de Peyer (PP) (ou nódulos linfóides agregados) no intestino delgado, onde ocorre a interação entre os antígenos luminiais e o sistema imune, e um braço efetor, os linfócitos intraepiteliais (IEL - do inglês intraepithelial lymphocytes), difusamente distribuídos, e os linfócitos intestinais da lâmina própria (LP) ao longo do trato intestinal (Bienenstock and Befus, 1980; Izcue *et al.*, 2009; Mowat, 2003).

Os sítios de indução da resposta imune na mucosa são as PP e os linfonodos mesentéricos (LMs). As PP são nódulos linfóides agregados de linfócitos B e T, células dendríticas (DCs) e macrófagos localizados sob o epitélio mucoso, que estão cobertos por

epitélio especializado; os LMs são os maiores linfonodos do corpo e servem como cruzamento entre as vias periféricas e de recirculação da mucosa. Para iniciar a indução de uma resposta imune na mucosa é preciso que os antígenos ou patógenos sejam transportados até as células apresentadoras de antígenos (APCs - do inglês, Antigen Presenting Cells), tais como macrófagos e DCs. Este transporte pode ocorrer através de vários mecanismos (Figura 2) (Gewirtz and Madara, 2001), sendo o mais simples a entrada diretamente pelas células do epitélio (Mowat, 2003) (Figura 2 - 1). Outro mecanismo é a passagem por células M (do inglês, Microfold Cells) (Figura 2 - 2) também presentes nas PP (Perdigón *et al.*, 2001). As células M são células do tipo epiteliais intercaladas entre as IECs capazes de capturar, via endocitose ou fagocitose, o conteúdo luminal e microrganismos e transporta-los à cúpula subepitelial (SED – do inglês, Subepithelial Dome), uma área povoada por células imunológicas, incluindo APCs, e um número variado de populações de DCs (Artis, 2008). Um mecanismo alternativo é a captação direta por DCs especializadas (Figura 2 - 3), localizadas na LP do intestino delgado, que são capazes de estender dendritos (prolongamentos) entre as zonas de oclusão do epitélio (das células epiteliais) e captar os antígenos no lúmen intestinal enquanto a barreira epitelial é mantida intacta (Rescigno *et al.*, 2001). Em comparação com as duas primeiras rotas de entrada, esta última pode ser utilizada por bactérias não invasivas assim como também para captar antígenos solúveis (Gewirtz and Madara, 2001).



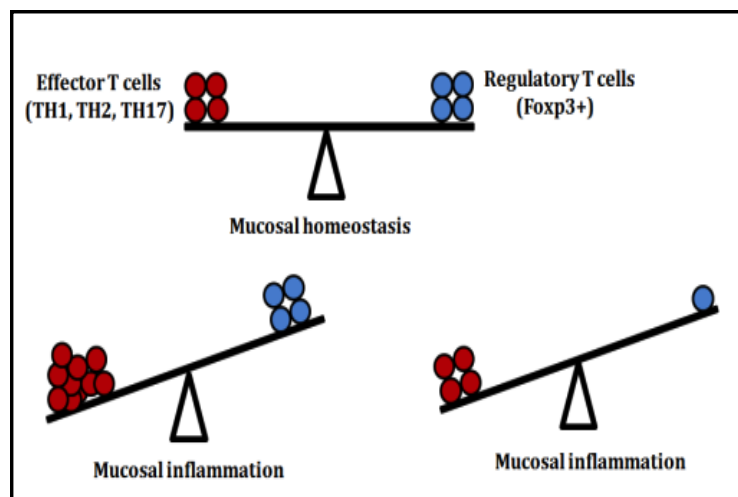
**Figura 2:** Mecanismos de transporte através do epitélio intestinal. A superfície do intestino está coberta por células epiteliais que formam “tight junctions” que impedem a passagem de microrganismos e macromoléculas. Algumas bactérias invasivas podem atravessar as células epiteliais diretamente (1), enquanto outras utilizam células M (2) e uma rota alternativa utiliza as projeções que as células dendríticas estendem ao lúmen intestinal através do epitélio (3). (Adaptado de Gewirtz and Madara, 2001).

Após interagirem com os antígenos, as DCs os apresentam às células T localizadas nos LMs estabelecendo uma comunicação entre a imunidade inata e a adaptativa. As

células T ativadas secretam citocinas estimulando as células B, que uma vez expostas ao antígeno, se diferenciam em plasmócitos capazes de produzir e secretar grandes quantidades de anticorpos IgA. A sIgA (IgA secretada) é a imunoglobulina mais abundante na mucosa do TGI e o seu papel é proteger o epitélio intestinal contra patógenos entéricos e toxinas. Após a entrada do antígeno, as DCs induzem a troca de isotipo para IgA nos LMs. A sIgA produzida pelos plasmócitos na LP contribui para os mecanismos de homeostase da mucosa, uma vez que estas reduzem a penetração de bactérias pelo epitélio intestinal. Diversas citocinas, incluindo TGF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, são necessárias para promover a troca de classe e a maturação para sIgA (Brandtzaeg, 1998; Suzuki and Fagarasan, 2008). Por fim, as células T e B juntas são capazes de criar uma poderosa linha de defesa contra os agentes infecciosos e exercer um papel na regulação da resposta imunológica na mucosa intestinal (Kutzler and Weiner, 2008).

Tanto as DCs quanto as IECs expressam uma grande variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - do inglês Pattern Recognition Receptor), os quais reconhecem componentes microbianos (MAMPs – do inglês, Microbe Associated Molecular Patterns) e são essenciais para a defesa inata contra patógenos (Artis, 2008; Winkler, 2007). Os MAMPs estão presentes em bactérias, fungos, protozoários e vírus, e incluem lipoproteínas, ácidos lipotéicos (bactérias Gram-positivas), lipopolissacarídeos (bactérias Gram-negativas), flagelinas bacterianas, peptideoglicanos e RNA (Akira and Takeda, 2004; Artis, 2008; Winkler, 2007). Os PRRs mais bem caracterizados são os receptores Toll-like (TLRs), normalmente associados com as membranas celulares e que participam da sinalização inata na superfície celular e nos endossomos, e os NOD-like (NLRs), que estão localizados no citoplasma de células epiteliais e células imunes e reconhecem ligantes intracelulares (Artis, 2008; Iwasaki and Medzhitov, 2004; Winkler, 2007).

Dessa maneira, as IECs juntamente com as células do sistema imune participam da iniciação e regulação da imunidade dirigida aos microrganismos. A falta de regulação do balanço entre tolerância e ativação de respostas imunes pode contribuir para inúmeras condições inflamatórias, incluindo respostas alérgicas aos alimentos ingeridos, doenças inflamatórias no intestino e até mesmo câncer intestinal (Artis, 2008). Indivíduos saudáveis apresentam uma resposta tolerogênica contra a microbiota intestinal e mostram um balanço entre células T efetoras e reguladoras (Figura 3). Quando este balanço é quebrado, por um aumento na população de células T efetoras ou por uma diminuição na população de células T reguladoras, a homeostase é quebrada levando ao desenvolvimento da inflamação da mucosa. A perda de tolerância para a microbiota intestinal normal pode ser observada em pacientes com doenças intestinais inflamatórias (Strober *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Colapso da homeostase da mucosa. Em condições saudáveis existe um balanço entre células T efectoras e reguladoras. Este balanço pode ser quebrado por um aumento na população de células T efectoras ou por uma diminuição na população de células T reguladoras, resultando na inflamação da mucosa. (Adaptado de Bouma and Strober, 2003).

## 2.2 As doenças inflamatórias do trato gastrointestinal

As doenças inflamatórias do trato gastrointestinal, também conhecidas como IBD (do inglês, Inflammatory Bowel Diseases) são doenças complexas crônicas cuja etiologia exata é desconhecida, no entanto, sabe-se que não são devidas a patógenos específicos. A Doença de Crohn (CD - do inglês Crohn's Disease) e a Colite Ulcerativa (UC - do inglês Ulcerative Colitis) são as duas formas principais da IBD idiopática, e apresentam como principais sintomas clínicos dor abdominal, diarreia, sangramento retal, mal-estar e perda de peso e aparecem intermitentemente, com períodos de remissão interrompidos por recaídas da doença que podem durar de semanas até meses. Enquanto a CD é um processo inflamatório multifocal e transmural (afeta todas as camadas da parede do intestino) que pode afetar grande parte do trato digestivo, a UC é caracterizada por uma inflamação contínua e superficial limitada ao intestino grosso ou cólon (Cho, 2008). A incidência destas doenças varia muito entre os diferentes países, mas nos últimos anos tem aumentado consideravelmente no mundo inteiro, sendo atualmente considerado um problema de saúde pública global (Nell *et al.*, 2010).

Os mecanismos patogênicos exatos envolvidos nas IBDs ainda não são completamente compreendidos e apesar da etiologia desconhecida, evidências demonstram que alguns fatores como predisposição genética, fatores associados ao meio ambiente, dano na tolerância local e desequilíbrio das mucosas com contínua ativação do sistema imune intestinal podem estar implicados na patogênese das IBD (Sartor, 2006; Sartor, 2008).



As opções de tratamentos existentes atualmente para as IBDs têm como objetivo controlar a inflamação, corrigir deficiências nutricionais e aliviar os sintomas, sendo restrito à utilização de drogas anti-inflamatórias, imunossupressores e antibióticos, assim como também suplementos nutricionais, intervenções cirúrgicas (colectomia) ou até uma combinação destas diferentes opções (Lakatos and Lakatos, 2007). No entanto, o efeito terapêutico moderado e a associação com sérios efeitos colaterais destas drogas revelaram que se faz necessário o desenvolvimento de novas terapêuticas capazes de suscitar respostas melhores e mais duradouras.

### 2.2.1 Modelos murinos de doenças inflamatórias intestinais

Modelos animais são importantes ferramentas para se investigar os mecanismos nos quais as doenças têm início e se perpetuam. Modelos animais de inflamação intestinal, em particular modelos murinos, têm se tornado indispensáveis para o entendimento de vários aspectos da patogênese das IBDs.

Os modelos murinos de inflamação intestinal induzidos quimicamente são os modelos animais mais comumente usados para estudo das IBDs, uma vez que o início da inflamação é imediato, o procedimento é relativamente simples e se assemelha em importantes aspectos imunológicos e histopatológicos às IBDs humanas (Wirtz *et al.*, 2007). Várias substâncias químicas já foram descritas como indutoras da colite em modelos animais, tais como o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), polímeros de polissacarídeo-peptídeoglicano, solução intra-retal de etanol 50% (v/v), ácido acético, indometacina, carrageina, polímero de PG-OS e sulfato de sódio dextrano (DSS) (Okayasu *et al.*, 1990).

O modelo de colite induzido por DSS foi originalmente descrito por Okayasu *et al.* (1990), é um dos principais modelos murinos utilizados atualmente devido principalmente à facilidade na indução e ao desenvolvimento de colite aguda semelhante à UC humana, em animais geneticamente susceptíveis. Na colite aguda, ocorre perda de peso, sangramento retal, encurtamento do cólon, destruição da camada epitelial e estrutura glandular do intestino. O infiltrado inflamatório é composto principalmente por neutrófilos que infiltram a base das criptas intestinais, afetando a estabilidade do epitélio intestinal (Okayasu *et al.*, 1990; Kitajima *et al.*, 1999; Melgar *et al.*, 2005; Kawada *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual o DSS promove a colite ainda não foi esclarecido, mas foi sugerido que este tem efeitos tóxicos no epitélio, aumentando a exposição aos antígenos luminiais pela destruição do conteúdo de mucina ou alterando a função dos macrófagos devido a fagocitose do DSS (Ni *et al.*, 1996; Kitajima *et al.*, 1999). Dessa forma, a perda da homeostase do epitélio intestinal causada pelo efeito tóxico direto do DSS consistiria em um evento inicial importante para a inflamação da mucosa (Kitajima *et al.*, 1999; Poritz *et al.*, 2007).

Dentre os modelos de inflamação espontânea, se destacam os camundongos deficientes em IL-10. Camundongos deficientes em IL-10 desenvolvem enterocolite crônica espontânea a partir dos 3 meses de idade e é o modelo que tem revelado mais semelhança com a CD humana (Kühn *et al.*, 1993). Camundongos deficientes em IL-10 mantidos em condições *germ free* não desenvolvem enterocolite, mas sim uma inflamação local limitada ao cólon proximal, evidenciando o importante papel da microbiota no desencadeamento da doença (Elson *et al.*, 2001). A enterocolite espontânea desenvolvida neste modelo animal parece ser originada a partir de respostas imunes incontroláveis estimuladas por antígenos entéricos, demonstrando que a IL-10 é um imunoregulador essencial no TGI e que desempenha um papel importante em controlar respostas imunes intestinais direcionadas à antígenos entéricos; na ausência desta citocina, o intestino, que representa a área do corpo constantemente exposta a antígenos, inflama (Strober *et al.*, 2007).

### 2.3 A Interleucina 10

A Interleucina-10 (IL-10) é um membro de uma família de citocinas diméricas ligadas não covalentemente. Outros membros dessa família incluem IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 e IL-26 (Abbas, 2008). A IL-10 humana consiste de um homodímero com massa molecular de 37 kDA e cada monômero consiste de 160 aminoácidos. O gene humano da IL-10 está localizado no cromossomo 1 e codifica 5 éxons (Mocellin *et al.*, 2004). A IL-10 humana e murina exibem 80% de homologia (Asadullah *et al.*, 2003).

A IL-10 foi inicialmente descrita como citocina do tipo T helper (Th2) inibidora da síntese de células Th1, sendo designada assim como fator inibidor da síntese de citocinas (CSIF – do inglês, Cytokine Synthesis Inhibitor Factor) (Lalani *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1992; Opal *et al.*, 1998; Fiorentino *et al.*, 1989). Evidências posteriores sugeriram que a produção da IL-10 estava associada a respostas celulares regulatórias (Treg). Hoje é sabido que a IL-10 é expressa por muitas células do sistema imune adaptativo, incluindo as células Th1, Th2 e Th17, células Treg, células T CD8+ e células B, assim como por células do sistema imune inato, tais como macrófagos, DCs, mastócitos, células NK, eosinófilos e neutrófilos (Moore *et al.*, 2001; Kamanaka *et al.*, 2006). Assim, a produção da IL-10 pode estar associada com muitas células imunes afirmando o seu papel crucial como regulador de diversas respostas imunes. Porém, a IL-10 também pode ser produzida por células não imunes como queratinócitos, células epiteliais e até células tumorais. Monócitos e células B são as maiores fontes da IL-10 em seres humanos (Moore *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2004).

Por ser produzida por vários tipos de células do sistema imune, a IL-10 tem a habilidade de afetar as diferentes funções destas e é assim considerada como uma

molécula amplamente efetora na imunoregulação/defesa do hospedeiro (Asadullah *et al.*, 2003). Geralmente, a IL-10 é considerada como uma molécula imunossupressora com a função biológica principal de limitar e terminar as respostas inflamatórias e regular a diferenciação e proliferação de várias células imunes, tais como células T, células B, células “*natural killer*”, células apresentadoras de antígenos, mastócitos e granulócitos (Asadullah *et al.*, 2003). Além do mais, a IL-10 inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias, tais como a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  e GM-CSF em monócitos, a IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e GM-CSF em células T<sub>H</sub>1 e a IL-4 e IL-5 por linfócitos T<sub>H</sub>2. Porém, a IL-10 também é capaz de modular propriedades imunoestimuladoras em vários modelos *in vitro* e *in vivo* (Mocellin *et al.*, 2004), especialmente em células B, como a indução da mudança para o isotipo  $\gamma$  e produção de IgG (Tournoy *et al.*, 2000). O balanço entre os efeitos imunoestimuladores e imunossupressores está influenciado pela função celular dominante. Assim, a IL-10 pode inibir a produção de mediadores pro-inflamatórios ou aumentar a produção de mediadores anti-inflamatórios (Asadullah *et al.*, 2003).

#### 2.4 Intervenções imunoterapêuticas utilizando a IL-10

Por desempenhar um papel central na regulação negativa da cascata inflamatória, suprimindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e simultaneamente aumentando a produção de mediadores anti-inflamatórios, a IL-10 se apresenta como uma forte candidata para uso em intervenções terapêuticas para tratamento de doenças inflamatórias, tais como as IBDs (Steidler *et al.*, 2000).

O papel crucial da IL-10 na prevenção das IBDs tem sido demonstrado por experimentos em camundongos IL-10 *knockout* (IL-10<sup>-/-</sup>), um dos modelos animais para o estudo das IBDs, que espontaneamente desenvolvem enterocolite quando não são mantidos em condições livres de germes (Kühn *et al.*, 1993). A doença em animais IL-10<sup>-/-</sup> é provavelmente perpetuada por superprodução crônica de citocinas, porém reversível, uma vez que a contínua administração da IL-10 pode transitoriamente curar a doença.

Assim, com base em dados pré-clínicos encorajantes, a administração sistêmica da citocina IL-10 humana (hIL-10) foi avaliada quanto à sua eficiência e segurança em pacientes com CD e UC (Fedorak *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 2000). Porém, os efeitos da hIL-10 recombinante (rhIL-10) observados só foram moderados e a porcentagem de pacientes que alcançaram a remissão clínica da doença não foi significativamente diferente entre os grupos de dose ativa e o grupo placebo, sendo os resultados clínicos insatisfatórios. Além do mais, para administração sistêmica desta proteína foram requeridos altos níveis de rhIL-10, aumentando o custo de produção, o desconforto e os efeitos colaterais nos pacientes. O tratamento sistêmico com rhIL-10

também se revelou limitado pela meia-vida curta da proteína recombinante e pelo fato desta induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ ) por células T-helper quando administrada em concentrações altas (Schreiber *et al.*, 1995); o que explicaria porque quando concentrações mais altas de rIL-10 foram administradas, o efeito verificado foi menor (Fedorak *et al.*, 2000; Schreiber *et al.*, 2000). Por outro lado, a administração oral da proteína IL-10 recombinante, mesmo parecendo uma opção atrativa, é dificultada pela extrema sensibilidade de IL-10 ao ambiente do TGI, sendo esta degradada rapidamente após a administração, não conseguindo alcançar o sítio de inflamação. Sendo assim, nenhuma formulação oral da proteína rIL-10 está disponível atualmente (Steidler and Vandenbroucker, 2006).

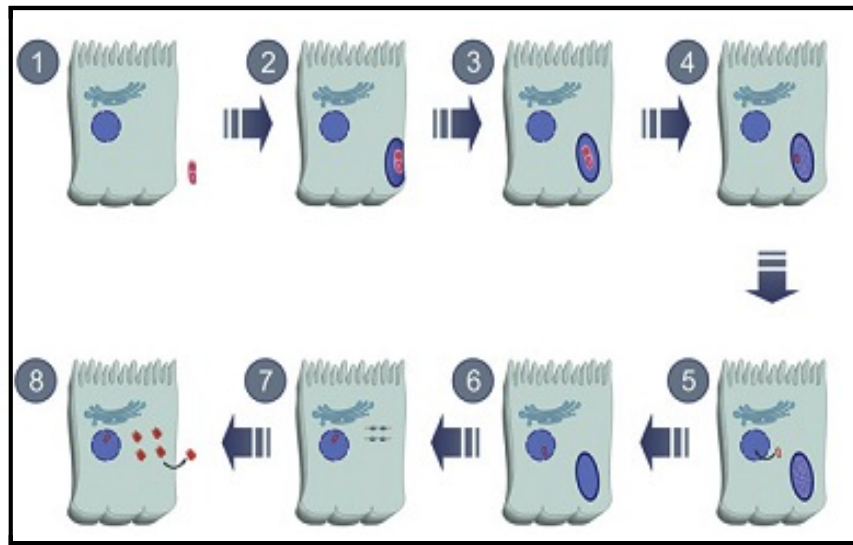
Para contornar estes problemas, o desenvolvimento de novas estratégias baseadas na entrega da IL-10 nas mucosas, diretamente nos sítios de inflamação faz-se necessário. A entrega da IL-10 diretamente no sítio da inflamação supera a necessidade de dosagens altas e assim previne o desenvolvimento de efeitos secundários pró-inflamatórios não desejados (Nell *et al.*, 2010).

## 2.5 Bactérias como veículos de entrega

Por serem uma das principais portas de entrada de patógenos e assim uma das primeiras linhas de defesa do organismo, as mucosas são um alvo atraente para a entrega de drogas biológicas como estratégia profilática e terapêutica. A administração de moléculas terapêuticas pelas vias de mucosa apresenta muitas vantagens importantes em relação à entrega sistêmica, tais como a redução de efeitos colaterais, fácil administração e possibilidade de modular tanto uma resposta imune de mucosas quanto sistêmica. Porém, grandes quantidades de proteína precisam ser administradas, uma vez que a maioria é degradada nas superfícies das mucosas, tais como no TGI (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011). Assim, o desenvolvimento de novas estratégias e de novos vetores, capazes de entregar as moléculas mais eficientemente aos tecidos alvos, têm recebido considerável atenção nos últimos anos. Neste contexto, o uso de bactérias como veículos para a entrega de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos, carreando moléculas de interesse pela rota oral, constitui uma estratégia de vacinação/terapêutica promissora (Schoen *et al.*, 2004).

Estudos realizados por Walter Schaffner em 1980 demonstraram que as bactérias são potenciais vetores para a transferência de plasmídeos vacinais às células de mamíferos, *in vitro*. A partir desta pesquisa, várias outras foram realizadas confirmando as bactérias como novos vetores a serem utilizados para transferência de vacinas gênicas (Schaffner, 1980; Courvalin *et al.*, 1995; Sizemore *et al.*, 1995; Vassaux *et al.*, 2006).

O primeiro passo para a entrega de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos por bactérias às células mamíferas consiste na internalização destas e captura por vesículas primárias da célula. Estas vesículas primárias são fundidas a um compartimento lisossômico, ocorrendo lise bacteriana. O plasmídeo é então liberado ao citoplasma da célula e translocado para o núcleo da célula, onde acontece a expressão da ORF de interesse e posterior apresentação ao sistema imune (Figura 4) (Schoen *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2011).



**Figura 4:** Representação esquemática da transferência de plasmídeos de DNA às células mamíferas mediada por bactérias. **(1)** A célula mamífera e a bactéria contendo o plasmídeo de interesse; **(2)** entrada da bactéria na célula alvo; **(3)** escape da bactéria do fagolisossomo; **(4)** lise bacteriana; **(5 e 6)** os plasmídeos são liberados ao citoplasma e transferidos ao núcleo da célula hospedeira; **(7)** dentro do núcleo acontece a expressão da ORF de interesse; **(7 e 8)** transcrição e tradução protéica pela maquinaria da célula hospedeira. (Adaptado de Pontes *et al.*, 2011).

Uma importante vantagem da entrega plasmidiana mediada por bactérias é a entrega direta no interior das células protegendo o plasmídeo contra a degradação e desnaturação por nucleases, além do fato de as próprias bactérias atuarem como adjuvantes naturais após a invasão da célula hospedeira, devido à presença de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs – do inglês Pathogen Associated Molecular Patterns), capazes de modular a resposta imune inata e assim promover uma resposta adaptativa robusta e duradoura (Hoebe *et al.*, 2004). Além do mais, as bactérias são capazes de acomodar plasmídeos de grande tamanho, o que possibilita a inserção de múltiplos genes de interesse, e este sistema é considerado relativamente de baixo custo já que a perpetuação do plasmídeo vacinal e/ou terapêutico ocorre pelo simples crescimento da cultura bacteriana. Além disto, a maioria das bactérias transportadoras permite a imunização da mucosa através de vias orais e nasais e revelam um tropismo natural pela indução do sistema imunológico, por gerar sinais de perigo ao hospedeiro, o que leva a uma ativação

mais eficiente do sistema imunológico (Schoen *et al.*, 2004) e, em geral, o uso de vetores bacterianos evita a necessidade de purificação protéica.

Atualmente, bactérias patogênicas intracelulares atenuadas, tais como *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella thiphymurium*, têm sido amplamente utilizadas para a entrega de vetores de expressão eucariótica em células mamíferas (Daudel *et al.*, 2007). O uso destas linhagens bacterianas é interessante uma vez que, mesmo atenuadas, estas são naturalmente capazes de interagir com a superfície das mucosas e infectar células mamíferas, facilitando a transferência dos plasmídeos de interesse. Porém, estes organismos apresentam certo risco de reversão da patogenicidade, não sendo totalmente seguros para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002).

Neste contexto, o uso de bactérias não patogênicas e comensais, tais como as Bactérias Lácticas (BL), como veículo para a entrega de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos representaria uma alternativa atrativa em relação ao uso de patógenos atenuados no desenvolvimento de novas estratégias preventivas e terapêuticas para uso em humanos (Stahl *et al.*, 1997; Glenting and Wessels, 2005).

### 2.5.1 Bactérias Lácticas

As Bactérias Lácticas (BL) constituem um grupo filogeneticamente heterogêneo de microrganismos ubíquos, que ocupam uma grande variedade de nichos ecológicos, que vão desde a superfície das plantas até o trato gastrointestinal dos animais. Atualmente, 32 gêneros bacterianos com porcentagem de G+C no genoma inferior a 55% compõem o grupo das BL (König and Fröhlich, 2009), dentre os quais estão incluídos os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* e *Lactobacillus*, sendo este último o maior representante do grupo contendo cerca de 80 espécies (Carr *et al.*, 2002).

Embora sejam bastante diversos, os membros desse grupo apresentam várias características em comum, incluindo o fato de serem: (i) Gram-positivos; (ii) anaeróbios facultativos, (iii) não formarem esporos, (iv) serem imóveis, e, especialmente (v) serem capazes de metabolizar açúcares, principalmente, em ácido láctico; característica essa que consagrou o nome a este grupo de bactérias (Carr *et al.*, 2002).

Com poucas exceções, as BL obtêm sua energia a partir da conversão de açúcares, principalmente a glicose, em ácido láctico (via homofermentativa ou homoláctica) e/ou ácido láctico e outros produtos (via heterofermentativa ou mista) (Carr *et al.*, 2002). Conseqüentemente, as BL estão geralmente associadas com a preparação de alimentos fermentados, como iogurtes, queijos, leites fermentados, pães, manteiga, vinhos, salsichas,

picles e silagem. Este processo, conhecido como "fermentação láctica dos alimentos", remonta a cerca de 8.000 a.C. e constitui uma das formas mais antigas de conservação dos alimentos utilizados pelos seres humanos (Tailliez, 2001). A conservação dos alimentos utilizando essas bactérias ocorre não apenas como consequência da acidificação do meio (pH 4,5-3,5), mas também devido à produção de numerosos agentes antibacterianos, tais como bacteriocinas e compostos orgânicos (van de Guchte, 2001). Esses dois fatores inibem o crescimento de uma microbiota indesejável e são responsáveis pelo desenvolvimento de algumas características organolépticas, tais como aroma, textura e sabor do produto final.

Por serem utilizadas há séculos em processos de fermentação e preservação de alimentos, as BL são diariamente ingeridas por seres humanos sendo consideradas seguras para consumo humano característica que rendeu ao grupo um "status" GRAS (GRAS - do inglês Generally Recognized As Safe) de acordo com o Food and Drug Administration (FDA), órgão americano que fiscaliza medicamentos e alimentos (Van de Guchte *et al.*, 2001).

Recentemente o potencial para novas aplicações das BL, tais como vacinas orais, produção de proteínas heterólogas e metabólitos vêm sendo explorado por vários grupos de pesquisa. Estas bactérias têm sido utilizadas como "usinas celulares" para a produção de moléculas de interesse médico e biotecnológico, como citocinas, enzimas, alérgenos e antígenos (Nouaille *et al.*, 2003; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004) e também utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos exógenos às superfícies de mucosas (Mercenier *et al.*, 2000). Atualmente, alguns estudos envolvendo as BL têm se concentrado em sua utilização como veículo para entrega de vacinas de DNA (Guimaraes *et al.*, 2006; Chatel *et al.*, 2008, Innocentin *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2011); utilizando principalmente a bactéria láctica modelo *Lactococcus lactis*.

## 2.6 *Lactococcus lactis*

*Lactococcus lactis* é a espécie de BL mais bem caracterizada e figura atualmente como organismo modelo no estudo das mesmas; não apenas pela sua importância econômica, mas também devido ao fato de: (i) ser um microrganismo de fácil manipulação; (ii) ser "GRAS"; (iii) ter sido a primeira BL cujo genoma foi sequenciado (Bolotin *et al.*, 2001) e (iv) possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (Duwat *et al.*, 2000; Bolotin *et al.*, 2001; Nouaille *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2006) como, por exemplo, sistemas de mutagênese (Maguin *et al.*, 1996) e vetores de clonagem e expressão gênica (Poquet *et al.*, 1998; Ravn *et al.*, 2000).

*L. lactis* é resistente à acidez gástrica quando administrada junto com os alimentos, mantendo-se biologicamente ativa em todo o trajeto através do trato digestivo (Bernasconi *et al.*, 2002). Além disso, por ser uma bactéria não-invasiva e não-comensal, isto é, de passagem transitória através do intestino dos animais, tem um menor potencial de desencadear imunotolerância ou efeitos colaterais sobre o seu uso prolongado (Nouaille *et al.*, 2003). Outra característica importante é que por ser uma bactéria Gram-positiva, *L. lactis* não possui o lipopolissacarídeo endotóxico LPS e ainda apresenta menos exoproteínas nativas em comparação com linhagens de *E. coli* (Bahey-El-Din and Gahan, 2010a).

Estas características, juntamente com os importantes avanços nas últimas décadas nas áreas de genética e sistemas de expressão, têm expandido o uso de *Lactococcus lactis*, a partir do seu uso tradicional na indústria alimentícia, para diversas aplicações em novas áreas. Conseqüentemente além do seu uso na indústria de alimentos e sua utilização como “usinas celulares” para a produção de moléculas tanto de interesse econômico quanto médico e biotecnológico, *L. lactis* também tem sido utilizada para a produção de vacinas vivas de mucosas para entrega de proteínas terapêuticas ou imunogênicas, enzimas e antígenos à superfície das mucosas pela via oral (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004), e revelando uma gama de aplicações promissoras para esse microrganismo (Wells and Mercenier, 2008).

#### 2.6.1 *L. lactis* como vacinas vivas de mucosas

A maioria dos estudos sobre *L. lactis* como uma vacina viva foram feitos utilizando o TTFC (fragmento C da toxina tetânica), um antígeno altamente imunogênico, sendo verificado um aumento significativo nos níveis de IgA após a imunização oral dos camundongos com as linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de TTFC (Norton *et al.*, 1995). Outros trabalhos também mostraram que os animais vacinados com *L. lactis* produtora da forma intracelular do mesmo antígeno desenvolveram altos níveis de IgG e IgA específicos contra TTFC e, posteriormente, esses animais tornaram-se resistentes ao desafio com a toxina tetânica (Wells *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 1997).

Posteriormente outros estudos analisaram o uso da co-expressão de citocinas para modular as respostas vacinais utilizando BL. Assim, a co-administração de uma linhagem de *L. lactis* expressando a proteína E7 ancorada à parede celular, o maior antígeno candidato para vacinas contra o câncer cervical relacionado ao HPV, e a forma secretada da IL-12, aumentou a proteção em um modelo de câncer de camundongo (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004). Seguindo essa linha, Steidler e colaboradores construíram linhagens recombinantes de *L. lactis* para eficiente síntese e secreção de proteínas eucarióticas, tais como a IL-2 e a IL-6 murinas e humanas. Nestes trabalhos, as linhagens recombinantes de *L. lactis*



produtoras tanto de antígenos modelos quanto de IL-2 e IL-6 foram capazes de potencializar em cerca de 10 a 15 vezes a resposta imune sistêmica antígeno-específica (Steidler *et al.*, 1998).

Estes e outros trabalhos reforçaram e confirmaram a capacidade de *L. lactis* de entregar moléculas biologicamente ativas, tais como antígenos e citocinas, às superfícies das mucosas para geração de respostas imunes específicas (Chatel *et al.*, 2001).

### 2.6.2 *Lactococcus lactis* secretoras da IL-10

Neste contexto, novas abordagens terapêuticas para o tratamento das IBDs foram exploradas visando a entrega da IL-10 diretamente nos sítios de inflamação utilizando linhagens de *L. lactis* geneticamente modificados para a entrega via mucosas.

Uma das primeiras linhagens de *L. lactis* recombinante capaz de secretar a IL-10 murina (mIL-10) biologicamente ativa foi construída no ano 2000 e se apresentou como uma promissora aplicação terapêutica de *L. lactis* recombinante (Schotte *et al.*, 2000). Neste estudo pioneiro, a mIL-10 foi sintetizada como uma proteína de fusão, consistindo da parte madura da proteína eucariótica fusionada ao peptídeo sinal da proteína Usp45 de *L. lactis*. A administração intragástrica desta linhagem recombinante impediu o desenvolvimento da UC experimental em camundongos IL-10<sup>-/-</sup> e causou uma redução em 50% da inflamação em camundongos com UC crônica induzida por DSS, utilizando uma dose 10.000 vezes menor do que a administrada sistemicamente (Steidler *et al.*, 2000).

Em 2003, Steidler e colaboradores substituíram o gene da timidilato sintase de *L. lactis* pela ORF da IL-10 humana (hIL-10), tornando este microrganismo incapaz de crescer quando privado de timidina ou timina (Steidler *et al.*, 2003). Esta linhagem não contém nenhum marcador de resistência a antibióticos e por causa da sua auxotrofia com relação à timidina, não pode se disseminar no meio ambiente, tornando-o um dos organismos geneticamente modificados (OGM) mais seguros já projetados (Braat, 2006). A eficácia desta linhagem foi avaliada em um primeiro ensaio clínico de fase 1 em paciente com DC e resultados preliminares deste estudo revelaram que a utilização de BL geneticamente modificadas para entrega de moléculas terapêuticas, como a IL-10, a nível de mucosa é uma estratégia viável para uso em humanos com inflamação intestinal crônica (Braat, 2006). Assim, foi realizado um ensaio clínico de fase 2 e no final do ano 2009 foi publicado um comunicado na imprensa revelando que a segurança e tolerabilidade, contenção ambiental e avaliação dos biomarcadores associados com as linhagens tinham sido alcançados. Porém, os resultados clínicos não revelaram uma diferença significativa na cicatrização da mucosa com relação ao grupo placebo (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011).

A administração de linhagens recombinantes de *L. lactis* secretoras da IL-10 não está limitada apenas para o tratamento das IBDs. Recentemente, Marinho e colaboradores (2010) avaliaram o efeito imunomodulador, após a administração intranasal de *L. lactis* expressando IL-10 recombinante, em camundongos no modelo de asma induzida por ovalbumina (OVA). Esse estudo demonstrou que a administração intranasal de *L. lactis* expressando IL-10 recombinante foi capaz de diminuir significativamente a resposta eosinofílica nas vias aéreas, os níveis das citocinas características da resposta imune do tipo Th2, IL-5 e IL-4, a presença das quimiocinas características da asma CCL2, CCL3, CCL5 e CCL11, e anticorpos específicos IgE, tornando os camundongos mais resistentes à indução da asma além de suprimir a inflamação pulmonar induzida pela sensibilização e desafio com OVA no modelo murino.

Todos estes estudos confirmam o potencial da IL-10 para tratamento e imunomodulação de diversas doenças inflamatórias. Contudo, um grande desafio consiste principalmente na otimização da expressão de genes eucarióticos. O processamento pós-traducional em *L. lactis* algumas vezes não é feito corretamente, pois modificações tais como glicosilações e formação de pontes dissulfeto são limitadas devido à falta da enzima dissulfeto isomerase. Isto resulta em uma quantidade muito baixa da forma ativa da proteína de interesse, como observado com a Interleucina 12 (IL-12) em *L. lactis* (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003a) e interferon omega ovino (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003b), devido a uma baixa taxa de formação passiva de pontes dissulfeto.

Assim, uma estratégia para contornar esse problema seria a utilização de bactérias para entregar plasmídeos contendo cassetes de expressão eucariótica, onde as modificações pós-traducionais da proteína de interesse seriam realizadas pelas células eucarióticas hospedeiras. Assim, a utilização das BL, destacando-se *L. lactis*, como um veículo para a entrega de plasmídeos de DNA pode representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas de DNA.

## 2.7 *Lactococcus lactis* como carreador de plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos

Como alternativa ao uso de linhagens recombinantes de *L. lactis* foram desenvolvidas novas linhagens, as quais são invasivas e capazes de entregar, diretamente às células mamíferas do hospedeiro, plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos para a expressão *in situ* da ORF do gene de interesse. Esta nova estratégia poderia garantir uma entrega mais efetiva e direcionada do plasmídeo e conseqüentemente uma produção maior e mais eficiente da molécula de interesse no sítio de inflamação. Além disso, pelo fato da proteína ser produzida pelas células hospedeiras, as modificações pós-traducionais necessárias também seriam feitas pela própria maquinaria celular eucariótica.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa, em colaboração com o grupo do Dr. Philippe Langella do Instituto Nacional de Pesquisas Agrônomicas (INRA, França), desenvolveu e testou linhagens de *L. lactis* recombinantes capazes de invadir e entregar plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos, contendo um cassete de expressão eucariótico, em células epiteliais humanas.

Guimarães e colaboradores utilizaram, em 2006, linhagens de *L. lactis* selvagens para a entrega, em células mamíferas, de um cassete de expressão eucariótico codificando o cDNA da proteína antigênica  $\beta$ -lactoglobulina bovina (BLG), a proteína do soro do leite de vaca mais abundante e considerada um alérgeno dominante, sob controle transcricional do pCMV (promotor do citomegalovírus) (Guimarães *et al.*, 2006). O co-cultivo dessas linhagens de *L. lactis* recombinantes e da linhagem epitelial Caco-2 confirmou a capacidade de *L. lactis* na entrega de DNA à células epiteliais, levando à expressão e secreção da proteína BLG por estas. As linhagens de *L. lactis* selvagens foram ainda capazes de entregar o cassete de expressão eucariótico a camundongos *in vivo*, sendo a proteína BLG detectada na membrana epitelial do intestino delgado de 53% dos camundongos testados (Chatel *et al.*, 2008).

Com o objetivo de melhorar e facilitar a entrega do DNA às células mamíferas (Innocentin *et al.*, 2009), uma nova estratégia consistiu na construção e avaliação de uma linhagem recombinante de *L. lactis* expressando a proteína de ligação Fibronectina A (FnBPA) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), capaz de invadir e entregar plasmídeos vacinais e/ou terapêuticos para células epiteliais humanas. A FnBPA medeia a adesão da bactéria ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas (Sinha *et al.*, 2000) e foi demonstrado que *L. lactis* expressando FnBPA foi capaz de entregar um plasmídeo de expressão eucariótica funcional à linhagem celular humana Caco-2 (Innocentin *et al.*, 2009). Além disso, um novo plasmídeo chamado pValac (Vaccination using Lactic acid bacteria) foi construído a partir da fusão do (i) pCMV, que permite a expressão da molécula em células eucarióticas, (ii) de um sítio de clonagem múltipla, (iii) da sequência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH poli-A), para estabilização do transcrito de RNA mensageiro, (iii) de origens de replicação que permitem a propagação do plasmídeo tanto em *E. coli* (repA) quanto em *L. lactis* (repC), e (iv) um gene de resistência ao cloranfenicol para seleção de linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009).

Deste modo, estas estratégias combinam as vantagens da imunidade de mucosas com a simplicidade da técnica e o baixo custo da vacina de DNA, além da segurança de utilização destas bactérias que são consideradas não patogênicas (Guimarães *et al.*, 2005). Assim, o uso de linhagens invasivas de *L. lactis* para a entrega do pValac contendo a ORF

da IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória, poderia representar uma nova estratégia para a prevenção e tratamento de doenças inflamatórias com as IBDs.

### **3.OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Construir e avaliar a funcionalidade, em células mamíferas, de um plasmídeo terapêutico codificando a Interleucina 10 (IL-10) de *Mus musculus*, utilizando linhagens de *L. lactis* invasivas como veículos carreadores, como nova estratégia para o desenvolvimento de uma futura terapêutica alternativa para as doenças inflamatórias intestinais.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Construção do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10
  - o Isolamento da sequência codificadora da IL-10 de *M. musculus*
  - o Clonagem da sequência codificadora da IL-10 de *M. musculus* no vetor Zero Blunt® TOPO®
  - o Subclonagem da sequência codificadora da IL-10 de *M. musculus* no vetor pValac
- Verificação da funcionalidade do plasmídeo
  - o Transfecção de células mamíferas Flp-In™-CHO com o plasmídeo pValac::IL-10
  - o Verificação da expressão e produção, *in vitro*, da IL-10 pelas células transfectadas através das metodologias de Western Blot, ELISA, Imunocitoquímica e FACS
- Construção de linhagens recombinantes de *L. lactis*
  - o *L. lactis* MG1363 (pValac::IL-10)
  - o *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10)
- Ensaio-piloto para avaliação *in vivo* do efeito terapêutico do pValac::IL-10 em modelo murino
  - o Avaliação do efeito terapêutico do plasmídeo pValac::IL-10 em camundongos com IBD experimental

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem.

As linhagens bacterianas e os plasmídeos usados no presente trabalho estão listados e representados na Tabela 1 e Figura 5 respectivamente.

**Tabela 1:** Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.

Linhagem	Características	Fonte
<i>Escherichia coli</i> TG1	[(supE, hsd, Δ5, thi, Δlac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZΔ M15)]	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> (TG1) pValac::gfp	( <i>E. Coli</i> TG1 portando o plasmídeo pValac::gfp, Cm <sup>r</sup> ) <sup>a</sup>	Guimarães <i>et al.</i> , 2009
<i>Escherichia coli</i> (TG1) pValac::IL-10	( <i>E. Coli</i> TG1 portando o plasmídeo pValac::IL-10, Cm <sup>r</sup> )	Este trabalho
<i>Lactococcus lactis</i> (MG1363)	<i>L. lactis</i> tipo selvagem (wt) <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <sup>b</sup>	LGCM
<i>Lactococcus lactis</i> (NCDO2118)	<i>L. lactis</i> tipo selvagem (wt) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <sup>b</sup>	LGCM
<i>Lactococcus lactis</i> (MG1363) FnBPA <sup>+</sup>	( <i>L. lactis</i> MG1363 portando o plasmídeo pOri23::fnbPA, Ery <sup>r</sup> ) <sup>b</sup>	Que <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactococcus lactis</i> FnBPA <sup>+</sup> pValac::IL-10	( <i>L. lactis</i> MG1363 portando os plasmídeos pOri23::fnbPA, Ery <sup>r</sup> e pValac::IL-10, Cm <sup>r</sup> )	Este trabalho
Plasmídeo	Características	Fonte
pUC19	(ori ColE1/Amp <sup>r</sup> ) <sup>c</sup>	Invitrogen
pJ201::IL-10	(pUC/Kan <sup>r</sup> /IL-10) <sup>d</sup>	DNA 2.0
pValac::gfp	(pCMV/Cm <sup>r</sup> /RepA/RepC/gfp) <sup>e</sup>	Guimarães <i>et al.</i> , 2009
pValac::IL-10	(pCMV/Cm <sup>r</sup> /RepA/RepC/IL-10) <sup>e</sup>	Este trabalho
pOri23-fnbA	Vetor shuttle (fnbA/ori ColE1/P23/Ery <sup>R</sup> ) <sup>f</sup>	Que <i>et al.</i> , 2001
Zero Blunt® TOPO®	Vetor de clonagem: (Plac/lacZα/ccdB/Km <sup>r</sup> /Zeo <sup>r</sup> /pUC ori) <sup>g</sup>	Invitrogen
pTOPO::IL-10	(Plac/lacZα/ccdB/Km <sup>r</sup> /Zeo <sup>r</sup> /pUC ori/IL-10) <sup>h</sup>	Este trabalho

<sup>a,b</sup> Linhagens de *E. coli* e *L. lactis* pertencentes ao Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em colaboração com o grupo do Dr. Philippe Langella, do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA, França).

<sup>c</sup>pUC19: ori ColE1: origem de replicação; Amp<sup>r</sup>: gene que confere resistência à ampicilina.

<sup>d</sup>pJ201::IL-10: pUC: origem de replicação; Km<sup>r</sup>: gene que confere resistência à canamicina; IL-10: Sequência codificadora da Interleucina 10 (IL-10) de *Mus musculus*.

<sup>e,f</sup>pValac::gfp: pCMV: promotor do citomegalovírus; Cm<sup>r</sup>: gene que confere resistência ao cloranfenicol; RepA: origem de replicação para *E. coli*; RepC: origem de replicação para *L. lactis*; gfp: sequência codificadora da proteína verde fluorescente; IL-10: sequência codificadora da Interleucina 10 (IL-10) de *Mus musculus*.

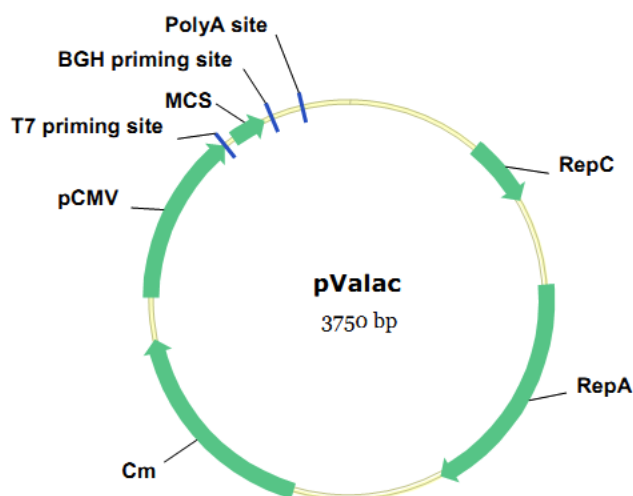
<sup>f</sup>pOri23-fnbA: fnbPA: sequência codificadora da proteína FnBPA de *Staphylococcus aureus*; ori ColE1: origem de replicação; P23: promotor cromossômico de *L. lactis* 1363; Ery<sup>r</sup>: gene que confere resistência à eritromicina.

<sup>g</sup>Zero Blunt® TOPO®: P<sub>lac</sub>: promotor do operon lac; lacZα: sequência codificadora da β-galactosidase; ccdB: gene letal; Km<sup>r</sup>: gene que confere resistência à canamicina; Zeo<sup>R</sup>: gene de resistência a zeomicina; pUc ori: origem de replicação.

<sup>h</sup>pTOPO::IL-10: P<sub>lac</sub>: promotor do operon lac; lacZα: sequência codificadora da β-galactosidase; ccdB: gene letal; Km<sup>r</sup>: gene que confere resistência à canamicina; Zeo<sup>R</sup>: gene de resistência a zeomicina;



pUc ori: origem de replicação; IL-10: sequência codificadora da Interleucina 10 (IL-10) de *Mus musculus*.



**Figura 5:** Representação esquemática do vetor de expressão eucariótica pValac (Vaccination using Lactic acid bacteria). pCMV: promotor do citomegalovírus; MCS: sítio de clonagem múltipla; BGH priming site e T7 priming site: primer para amplificação e/ou sequenciamento do inserto; polyA site: sequência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento; RepA: Origem de replicação para *E. coli*; RepC: Origem de replicação para *L. lactis*; Cm: Gene de resistência ao Cloranfenicol (Cm).

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) sob agitação à 37°C por um período de 18 horas e, quando necessário, o meio foi suplementado com 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Cm), ou 100 µg/mL do antibiótico ampicilina (Amp) ou 50 µg/mL do antibiótico canamicina (Km). Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado aos meios acima citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido à 37°C por 18 horas e em seguida, as culturas foram diluídas (1:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer à -80°C.

O meio de cultivo utilizado para as linhagens de *L. lactis* foi o meio M17 Glicose (M17-Gli) à 30°C, sem agitação, por um período de 20 horas, e quando necessário, o meio foi suplementado com Sacarose 0,5 M e/ou 5 µg/mL de eritromicina (Ery) e/ou com 5 µg/mL de Cm e 2,5 µg/mL de Ery. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado aos meios acima citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis* foram cultivadas em meio líquido à 30°C por 18 horas, e em seguida, as culturas foram diluídas (1:4) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer à -80°C.

#### Meios e soluções

**Luria-Bertani (LB):** 25g de meio LB (Accumedia®) foram pesados e em seguida foi acrescentada água destilada, completando-se o volume para 1 L. Para preparo de meio sólido, 1 L de meio LB

líquido foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico (Himedia®). Os meios foram esterilizados por autoclavação à 121°C durante 15 minutos. Composição: digestão enzimática de caseína 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; cloreto de sódio 10 g/L; pH 7,3 ± 0,2 à 25°C.

**M17 Glicose (M17-Gli):** 42 g de meio de cultivo M17 (Fluka Analytical® Sigma) foram pesados e dissolvidos em água destilada, completando-se o volume para 1L e foi esterilizado por autoclavação à 121°C durante 15 minutos. A glicose 50%, por sua vez, foi preparada dissolvendo-se 50 g de glicose anidra em água destilada q.s.p 100 mL, sendo esterilizada utilizando-se um filtro de 0,22 µm. Em capela de fluxo laminar, o meio M17 e 10 mL de glicose 50% foram misturados, resultando em M17 e Glicose 0,5% (M17-Gli). Composição: triptona 2,5 g/L, peptona de carne 2,5 g/L; peptona de soja 5 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L; extrato de carne 5 g/L; glicerofosfato de sódio 19 g/L; sulfato de magnésio 0,25 g/L; ácido ascórbico 0,5 g/L; lactose 5 g/L; pH 7,0 ± 0,2 a 25°C.

**M17 Sacarose Glicose (M17-Sac-Gli):** 21 g de meio de cultivo M17 (Fluka Analytical® Sigma) foram pesados e dissolvidos em água destilada, completando-se o volume para 250 mL, sendo que o meio ficou concentrado 2X. A solução de sacarose foi preparada dissolvendo-se 85,5 g desta em água destilada até completar-se 250 mL, resultando em uma solução 1 M. O meio M17 e a solução de sacarose foram esterilizados, separadamente, por autoclavação à 121°C durante 15 minutos; a glicose 50%, por sua vez, foi preparada dissolvendo-se 50 g de glicose anidra em água destilada q.s.p 100 mL, sendo esterilizada utilizando-se um filtro de 0,22 µm. Em capela de fluxo laminar, o meio M17, a solução de sacarose e 5 mL de glicose 50% foram misturados, resultando em M17 1X, Sacarose 0,5 M e Glicose 0,5% (M17-Sac-Gli). Composição: triptona 2,5 g/L, peptona de carne 2,5 g/L; peptona de soja 5 g/L; extrato de levedura 2,5 g/L; extrato de carne 5 g/L; glicerofosfato de sódio 19 g/L; sulfato de magnésio 0,25 g/L; ácido ascórbico 0,5 g/L; lactose 5 g/L; pH 7,0 ± 0,2 a 25°C.

**Cloranfenicol (10 mg/mL):** 100 mg de cloranfenicol foram dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto PA e a solução foi esterilizada, com o auxílio de um filtro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar.

**Ampicilina (100 mg/mL):** 1000 mg de ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água ultrapura e a solução foi esterilizada, com auxílio de um filtro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar.

**Eritromicina (50 mg/mL):** 500 mg de eritromicina foram dissolvidos em 10 mL de etanol absoluto PA e a solução foi esterilizada, com auxílio de um filtro de 0,22 µm, em capela de fluxo laminar.

**Glicerol (80%):** 80 mL de glicerina foram diluídos em 20 mL de água ultrapura e em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

## 4.2 Manipulação do DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação dos DNAs plasmidiano foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook *et al.*, 1989) com algumas modificações (especificadas quando necessário) e/ou segundo a recomendação dos fabricantes. A qualidade do material obtido, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada através da resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e também por leitura em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 v3.5.2 (Thermo Fisher Scientific) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações dos fabricantes e as sequências nucleotídicas dos insertos foram confirmadas através de sequenciamento (Sanger *et al.*, 1977).

### 4.3 Resolução Eletroforética

Todas as amostras de DNA foram resolvidas em gel de agarose, da seguinte maneira: ao DNA foi adicionado tampão de amostra 5X e o mesmo foi resolvido em gel de agarose à 1% em tampão TBE 0,5X, contendo 3,5% de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As resoluções eletroforéticas foram realizadas a 100 Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado em fotodocumentador MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP), onde o gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm, através do sistema de documentação fotográfica Doc-It® LS Image Acquisition Software (UVP). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

#### **Soluções**

**Brometo de etídeo:** Solução estoque a 5 mg/mL; Utilizou-se a 0,5 µg/mL.

**TBE (0,5X):** 100 mL de TBE 5X (54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 - 8,5; água destilada q.s.p 1 L) em água destilada q.s.p 1 L.

**Tampão de amostra:** Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X.

### 4.4 Clonagem da ORF IL-10 no sistema TOPO

#### 4.4.1 Produção de *Escherichia coli* eletrocompetente

Para produção de células de *E. coli* eletrocompetentes, 100 µL de uma cultura de *E. coli* TG1 foram inoculados em 5 mL de meio LB sem antibiótico e este inóculo foi incubado à 37°C, sob agitação, por um período de 18 horas. Após esse tempo, uma alíquota de 3 mL dessa cultura foi inoculada em 300 mL de meio LB sem antibiótico e incubada à 37°C, sob agitação, até atingir uma densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) entre 0,2 e 0,3. Uma vez alcançada a  $DO_{600nm}$  desejada, a cultura foi resfriada em gelo por 30 minutos, redistribuída em seis tubos tipo *falcon*, com 50 mL de cultura em cada, e estes foram centrifugados a 4.000 rotações por minuto (rpm), durante 20 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi então descartado e se seguiu a lavagem e ressuspensão do pellet celular adicionando a cada tubo 40 mL de uma solução estéril e gelada de glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido por mais três vezes e após a última lavagem, o pellet celular unificado foi ressuspensão em 1 mL da solução de glicerol 10% e foi estocado à -80°C em alíquotas de 100 µL.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota das células eletrocompetentes foi descongelada em gelo durante 5 minutos. Em seguida, adicionou-se

10 ng do plasmídeo pUC19 (Amp<sup>r</sup>) e a mistura de células eletrocompetentes e DNA foi transferida para cubetas de eletroporação (0,2 cm; BIO-RAD), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2500 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω, utilizando-se o eletroporador *GenePulser Xcell*<sup>TM</sup> (BIO-RAD). Imediatamente após o pulso, adicionou-se às células 1 mL de meio LB à 37°C e estas foram incubadas também à 37°C, sem agitação, por duas horas. Em seguida, diluições de 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> foram semeadas em placas contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e mantidas em estufa à 37°C durante 18 horas.

### Soluções

**Glicerol (10%):** 100 mL de glicerina foram diluídos em 900 mL de água destilada e em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavação à 121°C durante 15 minutos.

#### 4.4.2 Amplificação da ORF IL-10

O plasmídeo pJ201, sintetizado pela empresa norte-americana DNA 2.0, o qual contém a sequência nucleotídica de 537 pb referente a sequência codificadora da IL-10 de *M. musculus*, foi recebido depositado em um papel filtro circular. Este papel foi colocado sob uma superfície limpa e estéril e a ele foram adicionados 100 µL de água ultrapura. Passados 2 minutos de incubação à temperatura ambiente, o papel filtro foi transferido para um microtubo de 0,5 mL contendo um orifício ao fundo e o mesmo foi colocado dentro de outro microtubo, de 1,5 mL. Este sistema foi centrifugado a 14.000 rpm durante 1 minuto e o DNA foi então recuperado.

Para o isolamento do fragmento de DNA de 537 pb, referente a sequência codificadora da IL-10 de *M. musculus*, foi feita amplificação por PCR usando como molde o plasmídeo pJ201 (Tabela 1). Baseados na sequência do DNA genômico de IL-10 de *M. musculus*, depositada no Genbank (ID16153), foram confeccionados dois oligonucleotídeos iniciadores (primers) de forma complementar à sequência codificadora de IL-10, contendo adaptadores com sítios de restrição em cada extremidade (*Bam*HI e *Eco*RV) e a sequência de Kozak (ACCATG) iniciando a ORF IL-10 no primer *Forward*. As sequências dos primers, dos sítios de restrição e o tamanho do fragmento amplificado se encontram na Tabela 2.

**Tabela 2:** Primers que foram utilizados para a amplificação, por PCR, da ORF IL-10.

Primer <i>Forward</i> de IL-10: IL-10F <sup>a</sup>	5' – <u>GGATCC</u> <b>ACCATG</b> GCTGGCTCAGCACTGCTATGC – 3'
Primer <i>Reverse</i> de IL-10: IL-10R <sup>b</sup>	5' – <u>GATATCT</u> TAGCTTTTCATTTTGATCATCAT – 3'
Tamanho do fragmento amplificado	537 pb

<sup>a</sup>: Primer Forward da IL-10: O adaptador contém uma sequência de sítio de restrição para a enzima *Bam*HI (sublinhado) e a sequência de Kozak (negrito); T<sub>m</sub>: 57°C.

<sup>b</sup>: Primer Reverse da IL-10: O adaptador contém uma sequência de sítio de restrição para a enzima *Eco*RV (sublinhado); T<sub>m</sub>: 57°C.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 5 µL do tampão de amplificação *Pfx* 10X (Invitrogen), 1 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1 µL de MgSO<sub>4</sub> 50mM (Invitrogen), 1 µL do *primer* IL-10 forward e 1 µL do *primer* IL-10 reverse, ambos a 100 pmol/µL, 1 µL (20 ng/µL) do DNA plasmideano pJ201, 0,5 µL da enzima DNA polimerase *Pfx* Platinum<sup>®</sup> 2,5 U/µL (Invitrogen) e 39,5 µL de água ultrapura estéril. Para controle negativo da reação, foi adicionada água ultrapura estéril ao invés de DNA. A amplificação foi realizada em um aparelho termociclador modelo *ATC 401* (NYX TECHNIK, Inc.), sob as condições descritas na Tabela 3.

**Tabela 3:** Condições de amplificação, por PCR, da ORF IL-10

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Primeira desnaturação	94	5 minutos	} 30
Desnaturação	94	30 segundos	
Anelamento	57	30 segundos	
Extensão	68	1 minuto	
Extensão final	68	7 minutos	

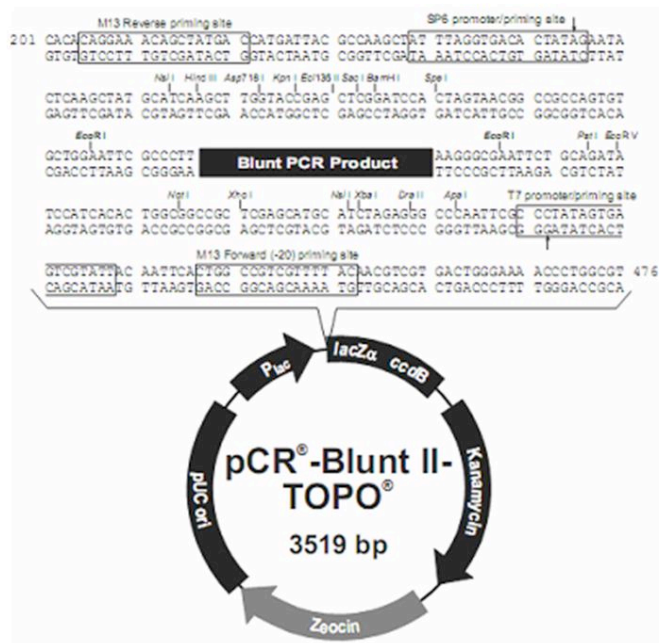
Ao final da reação de PCR descrita acima, o volume total da reação de PCR foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1%, como descrito no item 4.3 e o fragmento de DNA esperado para a ORF IL-10 (537 pb) foi purificado com o Kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA purificado foi então estimada através de resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e a leitura realizada em espectrofotômetro.

#### 4.4.3 Ligação da ORF IL-10 no vetor Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> e transformação em *E. coli*

O amplicon purificado e correspondente à ORF IL-10 foi submetido a uma reação de ligação no vetor Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> (Figura 6) (Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup> PCR Cloning Kit, Invitrogen) para a geração do plasmídeo intermediário pTOPO::IL-10 (Tabela 1). A ligação foi realizada conforme as instruções do fabricante. O produto de ligação (pCR<sup>®</sup>-Blunt II-TOPO<sup>®</sup> e inserto IL-10) foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1 preparadas de acordo com o protocolo descrito no item 4.4.1, com eficiência de 1 x 10<sup>7</sup> UFC por micrograma de DNA.

A transformação foi conduzida por eletroporação seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item 4.4.1. Para tanto, uma alíquota (6  $\mu$ L) do produto de ligação foi misturada com 100  $\mu$ L de células eletrocompetentes e incubada no gelo por 10 minutos.

A eletroporação foi realizada no aparelho GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD). Para o controle negativo, 100  $\mu$ L de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de DNA.



**Figura 6:** Representação esquemática do vetor Zero Blunt® TOPO®, destacando-se o sítio de clonagem múltipla. Os sítios das respectivas enzimas de restrição estão indicados no local da clivagem. As setas indicam o início da transcrição para T7 e SP6 polimerases. A sequência de anelamento dos primers M13 Forward e Reverse, utilizados para o sequenciamento do produto da PCR (inserto), estão destacados na figura (Fonte: User Manual Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen).

Para a seleção dos transformantes, foram semeados alíquotas de 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L e o restante (700  $\mu$ L centrifugados), da suspensão de células eletroporadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 50  $\mu$ g/mL de canamicina. As culturas foram mantidas à 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes à Km. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a extração dos plasmídeos e confirmar a presença do inserto IL-10 nos mesmos.

#### 4.4.4 Extração do DNA plasmidiano de *E. coli*

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo 50  $\mu$ g/mL da canamicina e mantidos, por cerca de 18 horas, à 37°C sob agitação. Uma alíquota de 1 mL

de cada cultura foi estocada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  utilizando-se glicerol 80% na proporção de 1:1. O restante do inóculo foi transferido para tubos de microcentrifuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos com o kit *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme recomendações do fabricante ou pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações, como segue: 4 mL de inóculo crescido por aproximadamente 18 horas à  $37^{\circ}\text{C}$  foram centrifugados por 7 minutos a 13.000 rpm e o precipitado celular coletado e ressuspensão em 200  $\mu\text{L}$  da solução I. Em seguida, 400  $\mu\text{L}$  da solução II foram acrescentadas à mistura anterior. Após a inversão dos tubos (7 a 10 vezes) foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e, logo em seguida, 300  $\mu\text{L}$  da solução III. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (cerca de 500  $\mu\text{L}$ ) foi coletado em novos tubos onde foi feita a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto, 10% de Acetato de Sódio (3 M) e 1% de Glicogênio (20 mg/mL). Os tubos foram então incubados por aproximadamente 30 minutos em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Após esse período, foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Após lavagem com etanol 70% (1 mL), o precipitado foi ressuspensão em 20  $\mu\text{L}$  de água milli-Q estéril. Quando necessário, o DNA foi tratado com 1  $\mu\text{L}$  de RNase A (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em Banho Maria à  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item 4.3

#### **Soluções**

**Solução I (Ressuspensão):** Sacarose ou glicose 50 mM (1 mL); Tris-HCl 25 mM pH 8.0 (0,25 mL); EDTA 10 mM pH 8.0 (0,2 mL); água destilada q.s.p. 10 mL.

**Solução II (Lise):** NaOH 0,2 N (200  $\mu\text{L}$ ); SDS 1% (250  $\mu\text{L}$ ); água destilada q.s.p. 5 mL.

**Solução III (Neutralização):** acetato de potássio 5 M (60 mL); ácido acético glacial (11,5 mL); água destilada q.s.p. 100 mL.

**Glicogênio (20 mg/mL):** 100 mg de glicogênio dissolvidos em 5 mL de água Milli-Q.

**Acetato de Sódio (3 M):** 246 g acetato de sódio dissolvidos em 1 L de água destilada.

#### 4.4.5 Confirmação da presença e do peso molecular do inserto IL-10 clonado no vetor TOPO

Para verificar a presença do inserto e também o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup>, o inserto do DNA plasmidiano foi amplificado por PCR utilizando-se os mesmos iniciadores descritos na Tabela 3 e também digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RV.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 5  $\mu\text{L}$  5X *Green Go Taq<sup>®</sup> Flexi* (Promega); 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM (Promega); 1  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM;

0,5 µL do *primer forward* IL-10 e 0,5 µL do *primer reverse* IL-10, ambos a 100 pmol/µL; 0,5 µL da miniprep (100 ng/µL); 0,3 µL da enzima DNA polimerase Go Taq® 5 U/µL (Promega); 15,2 µL de água milli-Q estéril. A amplificação por PCR ocorreu em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) e foi realizada de acordo com as condições descritas na Tabela 4. Após a reação, 5 µL do produto amplificado foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1% sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

**Tabela 4:** Condições de amplificação por PCR

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Primeira desnaturação	94	5 minutos	} 30
Desnaturação	94	30 segundos	
Anelamento	57	30 segundos	
Extensão	72	1 minuto	
Extensão final	72	7 minutos	

A reação de digestão foi realizada em um volume de 20 µL, que consistiu em 10 µL de DNA da miniprep (50 ng/µL), 2 µL de tampão One-Phor-All (GE Healthcare), 1 µL da enzima *Bam*HI (Invitrogen), 1 µL da enzima *Eco*RV (Invitrogen) e 6 µL de água Milli-Q estéril. A reação foi mantida à 37°C por 18 horas. Logo após, 10 µL da reação de digestão foram depositados e resolvidos em gel de agarose à 1% sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

#### 4.5 Construção do plasmídeo pValac::IL-10

##### 4.5.1 Extração do plasmídeo pValac::*gfp*

A extração dos plasmídeos pValac::*gfp* foi realizada a partir de colônias de *E. coli* TG1 pValac::*gfp* (Tabela 1) inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado com 10 µg/mL do antibiótico cloranfenicol (Cm), utilizando o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) conforme as recomendações do fabricante. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese seguindo os parâmetros já descritos no item 4.3.



#### 4.5.2 Digestão enzimática do plasmídeo pValac::gfp

Para a clonagem da ORF IL-10 no vetor de expressão pValac (Figura 2), os plasmídeos extraídos (item 4.5.1) foram submetidos a uma reação de digestão enzimática para liberação da ORF *gfp* com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RV. A reação consistiu em 10 µL do plasmídeo pValac (100 ng/µL), 1,5 µL do tampão One-Phor-All (GE Healthcare), 1 µL de *Eco*RV (10 U/µL) e 1 µL da enzima *Bam*HI (10 U/µL) e 1,5 µL de água Milli-Q estéril, totalizando um volume final de 15 µL de reação. Esta reação foi mantida à 37°C “overnight”. Para verificar a qualidade da digestão, 3 µL da reação foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1% (item 4.3).

#### 4.5.3 Purificação do fragmento de DNA correspondente ao plasmídeo pValac desprovido da ORF *gfp*

O volume total da reação de digestão (item 4.5.2) foi depositada e resolvida em gel de agarose à 1% para purificação dos fragmentos de DNA correspondentes ao vetor pValac (3.750 pb), desprovidos da sequência codificadora da proteína verde fluorescente (*gfp*, 696 pb), utilizando o Kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos purificados foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e também em espectrofotômetro, assim como descrito no item 4.3.

#### 4.5.4 Digestão enzimática do pTOPO::IL-10 e purificação da ORF IL-10

O plasmídeo pTOPO::IL-10 foi extraído de *E. coli* TG1 a partir de um dos clones construídos e confirmados de acordo com o item 4.4. Em seguida, foi realizada uma reação de digestão enzimática que consistiu em: 30 µL de plasmídeos pTOPO::IL-10 (50 ng/µL); 4 µL de tampão “One-Phor-All” (GE Healthcare); 1 µL de *Bam*HI (10 U/µL); 1 µL de *Eco*RV (10 U/µL); 4 µL de água milli-Q estéril, totalizando-se um volume final de 40 µL. A reação foi mantida à 37°C “overnight”. O volume total da reação de digestão foi então depositado e resolvido em gel de agarose à 1%. Ao término da eletroforese, o fragmento de DNA correspondente a ORF IL-10 (aproximadamente 537 pb), provida das extremidades coesivas *Bam*HI e *Eco*RV, foi purificado com o Kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do produto purificado foi então estimado através de resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e também em espectrofotômetro, assim como descrito no item 4.3.

#### 4.5.5 Ligação da ORF IL-10 no vetor pValac

Os produtos digeridos e purificados correspondentes ao inserto IL-10 (item 4.5.4) e ao vetor pValac (item 4.5.3) foram submetidos a uma reação de ligação que conteve: 5 µL de IL-10 purificado (10 ng/µL); 3 µL de pValac purificado (30 ng/µL), o que resultou em uma proporção equimolar (3:1) de inserto/vetor; 1 µL de Ligase Buffer 10X (Promega); 1 µL da enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação foi mantida à temperatura de 16°C durante 18 horas. Após este período, a ligação foi dialisada utilizando-se membrana Millipore (filtro de 0,025 µm), durante 30 minutos em água destilada.

#### 4.5.6 Transformação de *E. coli* TG1 com o plasmídeo pValac::IL-10

O produto de ligação entre o vetor pValac e o inserto IL-10 foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1 por eletroporação conforme descrito (item 4.4.1), utilizando 10 µL do produto de ligação e 100 µL de células eletrocompetentes TG1. Como controle negativo foi transformado 100 µL de células eletrocompetentes sem adição de plasmídeo.

Para seleção de transformantes foram semeadas alíquotas de 100 µL e 200 µL em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 10 µg/mL de cloranfenicol (Cm). As culturas foram mantidas à 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes ao Cm.

#### 4.5.7 Confirmação da presença do inserto IL-10 no vetor pValac

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo Cm 10 µg/mL e mantidos à 37°C sob agitação por cerca de 18 horas. Uma alíquota (1 mL) de cada cultura foi estocada em freezer a -80°C, utilizando-se glicerol 80% na proporção de 1:1. O restante da cultura foi transferido para microtubos e procedeu-se com a extração plasmidiana pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989) com modificações conforme item 4.4.4.

Para verificar a presença do inserto e o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor pValac, o inserto do DNA plasmidiano foi amplificado por PCR utilizando os mesmos iniciadores descritos na Tabela 2 e 5 e digeridos com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Eco*RV.

**Tabela 5:** Primers correspondentes ao vetor pValac que foram utilizados na confirmação, por PCR, da construção pValac::IL-10

Primer Forward do pValac : ValF <sup>a</sup>	5' – GCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGG – 3'
Primer Reverse do pValac : ValR <sup>b</sup>	5' – GCAACTAGAAGGCACAGTCGAGG – 3'
Tamanho do fragmento amplificado	737 pb

<sup>a</sup>: Primer Forward do vetor pValac: Amplificação a partir de 105 pb anteriores ao sítio de *Bam*HI; Tm: 60°C.

<sup>b</sup>: Primer Reverse do vetor pValac: Amplificação a partir de 87 pb posteriores ao sítio de *Eco*RI; Tm: 60°C.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µL contendo: 5 µL 5X *Green Go Taq<sup>®</sup> Flexi* (Promega); 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega); 1 µL de dNTP 10 mM; 0,5 µL do *primer forward* IL-10 e 0,5 µL do *primer reverse* IL-10, ambos a 100 pmol/µL; 0,5 µL da miniprep (100 ng/µL); 0,3 µL da enzima DNA polimerase *Go Taq<sup>®</sup> 5 U/µL* (Promega); 15,2 µL de água milli-Q estéril. A amplificação por PCR ocorreu em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) e foi realizada de acordo com as condições descritas na Tabela 6. Após a reação, 5 µL do produto amplificado foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1% sob as mesmas condições descritas no item 4.3.

**Tabela 6:** Condições da reação de PCR para confirmação da construção pValac::IL-10

Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Primeira desnaturação	94	7 minuto	
Desnaturação	94	30 segundos	} 30
Anelamento	X <sup>a</sup>	30 segundos	
Extensão	72	1,5 minutos	
Extensão final	72	7 minutos	

X<sup>a</sup>: Temperatura de anelamento variável para cada iniciador específico: IL-10F e IL-10R: 57°C; ValF e ValR: 60°C.

Por outro lado, a reação de digestão foi realizada em um volume final de 15 µL, consistindo em 11,5 µL do DNA (100 ng/µL); 1,5 µL de tampão “*One-Phor-All*” (GE Healthcare); 1 µL da enzima *Bam*HI (10 U/µL) e 1 µL da enzima *Eco*RV (10 U/µL) e foi mantida à 37°C “*overnight*”. Após a reação, 3 µL da mesma foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1% sob as condições descritas (item 4.3).

## 4.6 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::IL-10 em cultura de células mamíferas

### 4.6.1 Cultura de Células CHO

Células da linhagem Flp-In<sup>TM</sup>-CHO (do inglês, Chinese Hamster Ovary) resistentes à Zeocina (Invitrogen), armazenadas à -196°C em nitrogênio líquido e contendo meio completo com 10% de DMSO (do inglês, Dimethyl Sulfoxide), foram descongeladas à temperatura ambiente e rapidamente colocadas em um tubo *falcon* com 3 mL do meio de cultura completo. As células foram então centrifugadas a 800 rpm, durante 5 minutos, à 25°C e o sobrenadante foi descartado. Às células foram acrescentados 5 mL de meio completo, estas foram transferidas a garrafas de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C (Thermo Electron Corporation) até formação de uma monocamada.

Para crescimento, as células foram crescidas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> em meio Nutriente Mixture F12 Ham (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina (Sigma), zeocina (100 ng/mL) e 2,5% de Herpes (Sigma) ou bicarbonato de sódio (Sigma) para manutenção do pH e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% à 37°C. Após a formação da monocamada celular, o meio foi descartado e as células foram tripsinizadas. Para tanto, a garrafa foi brevemente lavada com 2 mL de tripsina, sendo este conteúdo subsequentemente descartado e mais 1,5 mL de tripsina adicionado às células. A garrafa foi deixada em repouso por 3 minutos à 37°C, período após o qual lhe foram aplicadas batidas vigorosas para que as células desaderissem. O excesso de células foi descartado ou utilizado para montagem de nova garrafa ou de placas. Para continuação do crescimento e formação novamente de uma monocamada de células na garrafa, 10 mL de meio F12 completo foram adicionados à esta antes de voltar a estufa. No dia posterior à tripsinização, o meio de cultura foi trocado para eliminação de células mortas e/ou não aderidas. Todas as manipulações foram realizadas em uma capela de fluxo laminar exclusiva para cultivo celular.

#### **Meios e Soluções**

**Meio F12 Ham (Sigma):** o meio F12 foi preparado conforme recomendações do fabricante, esterilizado a vácuo utilizando-se filtro de 0,22 µm, sendo o pH ajustado para 7,0 e o meio armazenado à 4°C. O meio completo, por sua vez, foi preparado adicionando-se ao F12, 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina (Sigma), 100 ng/mL de zeocina e 2,5% de HEPES (Sigma), todos filtrados anteriormente ou estéreis. Após preparo, o meio F12 completo passou por um teste de esterilidade, onde 200 µL do meio foram colocados em meios de cultura para bactérias (BHI e TSB), fungos e leveduras (Sabouraud) e mantidos à 37°C ou temperatura ambiente, respectivamente. Além disto, 3 mL do meio completo também foram colocados em vidro estéril em estufa à 37°C. Durante 14 dias, o crescimento de bactérias e fungos foi acompanhado, sendo que com 5 dias sem contaminação, o meio pôde ser utilizado.

**L-glutamina (Sigma):** 14,6 g de L-glutamina foram dissolvidos em água ultrapura q.s.p. 500 mL. A solução foi esterilizada utilizando-se filtro de 0,22 µm.

**HEPES (Sigma) 1 M:** 23,9 g de HEPES foram dissolvidos em 80 mL de água ultrapura, o pH foi ajustado em 7,2 e completou-se o volume para 100 mL. A solução foi esterilizada utilizando-se filtro de 0,22 µm.

#### 4.6.2 Obtenção do DNA para transfecção

Os DNAs plasmídicos (pValac::IL-10 e pValac::gfp) utilizados para transfecção das células da linhagem CHO foram obtidos a partir das linhagens *E. coli* (pValac::IL-10) e *E. coli* (pValac::gfp), utilizando o Kit Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega) conforme recomendações do fabricante. Após a extração plasmideana, a concentração e pureza do DNA obtido foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e leitura em espectrofotômetro a 260 nm. No momento da transfecção, os respectivos DNAs foram esterilizados utilizando-se filtros de 0,22 µm.

#### 4.6.3 Padronização da transfecção de células mamíferas com o plasmídeo pValac::gfp utilizando Lipofectamine™ 2000

As células CHO, crescidas até a formação de monocamada (item 4.6.1), foram tripsinizadas, transferidas para um tubo tipo *falcon* e centrifugadas a 800 rpm, durante 5 minutos, à 25°C. O sedimento celular foi ressuspenso em 2 mL de meio F12 completo para posterior contagem das células em câmara de Neubauer. Placas de 6 poços foram utilizadas para transfecção, sendo que a cada poço foram adicionadas cerca de 200.000 células, além de 2 mL de meio F12 completo. As placas foram então mantidas em estufa de CO<sub>2</sub>, à 37°C, durante 48 horas para obtenção de confluência celular entre 90 a 95%, necessária à transfecção.

Para a padronização da transfecção, transcorrido o tempo necessário para a obtenção da confluência celular, o meio de cultura das placas foi substituído por 1,5 mL de meio F12 completo fresco, adicionados a cada poço. Foram utilizados 4 µg de DNA (pValac::gfp) diluídos em 250 µL de meio *Opti-MEM® I Reduced Serum Media* (Invitrogen) e o reagente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) nas proporções “DNA(µg):Lipofectamine(µL)” de: 1:2, 1:2,5 e 1:3, também diluídas em 250 µL de *Opti-MEM®*. As diluições “DNA – Opti-MEM” e “Lipofectamine – Opti-MEM” foram incubadas, separadamente, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, estas foram misturadas e mantidas em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente para vesicularização do DNA nos lipossomos. Por fim, a mistura foi adicionada aos poços (cerca de 520 µL por poço), sendo as placas incubadas em

estufa de CO<sub>2</sub>, à 37°C, por 24, 48 e 72 horas, a fim de se verificar a expressão da proteína GFP. O controle negativo do experimento consistiu em submeter as células ao tratamento com Lipofectamine e Optimem, mas não à transfecção com DNA. Como o meio de cultura pode ser trocado após 4 horas da transfecção, duas condições foram também testadas: manutenção do meio de cultura inicial ou sua troca por meio F12 completo fresco contendo 1% de uma suspensão de antibiótico e antimicótico estabilizada (Sigma).

Após a transfecção celular com o plasmídeo pValac::*gfp*, a fluorescência da proteína GFP pôde ser visualizada em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200, utilizando-se o filtro azul (objetiva de 20X). As imagens foram então capturadas em câmera AxioCam HRc (ZEISS) utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

#### 4.6.4 Transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac::*IL-10*

A partir da padronização de transfecção celular com o plasmídeo pValac::*gfp*, todos os experimentos de transfecção que seguiram com o plasmídeo de interesse pValac::*IL-10* foram realizados nas melhores condições obtidas durante a padronização; proporções “DNA(μg):Lipofectamine” 1:3 e sem troca do meio de cultura F12 completo após 4 horas de transfecção. Para todos os experimentos de transfecção sempre foi feita uma placa de controle positivo utilizando o plasmídeo pValac::*gfp*. A eficiência da transfecção de cada experimento foi visualizada por microscopia de fluorescência e após marcação imunocitoquímica das células transfectadas com o plasmídeo pValac::*IL-10* estas foram visualizadas utilizando um Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss.

#### 4.6.5 Extração de proteínas das células transfectadas

Após 24 horas de transfecção seguiu-se à extração proteica tanto das células transfectadas com o plasmídeo pValac::*IL-10* quanto das células não transfectadas (controle negativo). O precipitado celular de 3 poços foi lavado com PBS, ressuspenso em 50 μL de Tampão de Lise Celular contendo o Coquetel Inibidor de Protease (Roche), vortexado e incubado à 37°C por 10 minutos. Logo após, este foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e estocado à -20°C.

##### **Solução:**

**Tampão de Lise Celular:** 50 mM de Tris pH 7.8; 150 mM de NaCl e 1% de Nonidet P-40 (Roche). No momento da extração, em 250 μL da solução de lise, adicionou-se um volume de 35,7 μL de uma solução concentrada 7X de “Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets” (Roche).

4.7 Verificação da produção, por células da linhagem CHO, da proteína IL-10.

#### 4.7.1 Western Blotting

##### 4.7.1.1 Resolução eletroforética das proteínas em gel SDS-PAGE

As proteínas extraídas tanto das células transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10 quanto das células não transfectadas (controle negativo), foram resolvidas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE – “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”). Para isto foi utilizado gel de “separação” na concentração de 15% e o gel de “concentração” à 4%. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 180 V, 120 mA e 70 W em tampão de corrida Tris-glicina.

Aos géis foram aplicados 3 µL do padrão Page Ruler Protein Ladder (Fermentas) e 20 µL das proteínas em Tampão de amostra

#### **Soluções:**

**Acrilamida/Bisacrilamida:** 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

**Gel de Poliacrilamida 15% (separação):** 5 mL de acrilamida/bisacrilamida; 2,5 mL de Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 2,34 mL de água milli-Q; 70 µL de PSA 10% e 14 µL de TEMED.

**Gel de Poliacrilamida 4% (concentração):** 650 µL de acrilamida/bisacrilamida, 1,25 mL de Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 50 µL de SDS 10%, 3,05 mL de água milli-Q, 35 µL de PSA 10% e 7 µL de TEMED.

**Tampão de corrida Tris-glicina (10X):** 30 g de Tris-base, 144 g de Glicina, 10 g de SDS e água milli-Q q.s.p. 1 L (concentração de uso: 25 mM Tris; 250 mM glicina; 0,1% SDS).

**Tampão da Amostra:** 1 mL Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 800 µL de glicerol, 1,6 mL de SDS 10%, 200 µL de azul de bromofenol 2% e 4,6 mL de água milli-Q.

##### 4.7.1.2 Visualização dos extratos protéicos por Nitrato de Prata

Para visualização das proteínas provenientes tanto das células transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10 quanto das células não transfectadas (controle negativo), após serem os respectivos extratos protéicos resolvidos em SDS-PAGE, estes foram submetidos à coloração pelo método de Nitrato de Prata.

A coloração se iniciou com a imersão do gel de poliacrilamida na Solução Fixadora por 5 minutos, seguido de uma lavagem com água destilada por outros 5 minutos com leve agitação. Posteriormente, o gel foi imerso em Solução Oxidante, por 5 minutos com agitação, e depois lavado com água destilada por aproximadamente 10 minutos até observar uma diminuição da coloração “amarelada”. A seguir, o gel ficou submerso na

solução de Prata no escuro por 20 minutos e para finalizar foi enxaguado com água destilada e submetido à Solução Reveladora até aparecimento das bandas de interesse.

#### 4.7.1.3 Western Blotting

Para detecção da IL-10 proveniente das células transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10, após resolver os extratos protéicos em SDS-PAGE, este foi submetido ao método de Western Blot, junto com o controle negativo. Para proceder com a transferência, o gel foi colocado juntamente com a membrana de PVDF (do inglês, Polyvinylidene fluoride), previamente embebida em metanol, papel filtro e espuma em um cassete próprio, em Tampão de Transferência. A transferência foi realizada no sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad), nas condições 110 V de tensão, 250 mA de corrente e 50 W de potência.

Uma vez realizada a transferência para a membrana de PVDF e para imunodeteção da IL-10, foi feita a ligação do anticorpo e posterior revelação das proteínas. Assim, a membrana foi primeiramente mergulhada em Solução de Bloqueio e incubada por 30 minutos com agitação moderada, para saturar os sítios de ligação de proteínas não específicas. A continuação, a membrana foi lavada 3X por 5 minutos com PBS-Tween com agitação moderada, seguido por imersão na Solução do Anticorpo, utilizando o anticorpo primário monoclonal anti-IL-10 (Rat monoclonal para IL-10, SantaCruz) na concentração final de 0,5 µg/mL por 60 minutos com agitação moderada. Após esse tempo, a membrana foi lavada com PBS-Tween 3X por 5 minutos com agitação moderada para remoção dos anticorpos não ligados e mergulhada em 25 mL de Solução conjugado anti-IgG-peroxidase, diluída em PBS-Tween de acordo com recomendações do fabricante, por 60 minutos com agitação moderada. Para remover os anticorpos não ligados, a membrana foi lavada 3X por 5 minutos com agitação moderada e a continuação foi adicionada a Solução Reveladora preparada no momento. Quando a coloração ficou na intensidade desejada, a membrana de PVDF foi enxaguada em água deionizada para interromper a reação. Para finalizar, a membrana foi estocada em papel filtro, deixada a secar no ar e protegida da luz.

#### **Soluções**

**Tampão de Transferência (pH 8,3):** 3,03 g de Tris (25 mM), 14,4 g de glicina (192 mM), 200 mL de metanol (20%) e água destilada q.s.p. 1 L.

**Solução de Bloqueio:** 500 mg de Leite desnatado; 10 mL de PBS-Tween-20.

**PBS 0,15 M:** 137 mM de NaCl (8 g), 2,7 mM de KCl (0,2 g), 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,44 g), 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,24 g), água destilada q.s.p. 1 L; pH 7,4. A solução foi esterelizada por autoclavação.

**PBS 0,15 M e 0,1% de Tween-20:** 500 µL de Tween-20 em 500 mL de PBS 0,15 M.

**Solução Reveladora:** 6,01 mg de DAB em 10 mL de Tris pH 7,0.



#### 4.7.2 Ensaio imunoenzimático

Placas de 96 poços foram sensibilizados com anticorpo de captura (purificado) específico para a citocina de interesse IL-10, diluído em tampão de ligação na concentração de 1 µg/mL para iniciar a detecção da produção da IL-10 por ELISA (do inglês, Enzyme-linked immunosorbent assay). Após incubação por 16 horas a 4°C, a placa foi lavada com tampão de lavagem, as reações inespecíficas foram bloqueadas com 200 µL/poço de tampão bloqueio e a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens, as amostras foram adicionadas juntamente com a curva padrão da citocina recombinante diluída em PBS/SBF 10% Tween 20 a 0,05% e incubadas por 16 horas a 4°C. As placas foram novamente lavadas e o anticorpo anti a citocina de interesse conjugado à biotina (PharMingen) foi adicionada. Após o procedimento de lavagem, 100 µL/poço da solução avidina biotina peroxidase StrepAB kit™ (Dako) foi adicionado sendo incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após novo procedimento de lavagem, as placas foram reveladas pela adição da solução de OPD (Sigma) e a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 16% (Merck). A leitura da absorbância para observação da produção da IL-10 foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm (mQuant Bio-Tek Instruments Inc.).

#### 4.7.3 Imunocitoquímica - Marcação com Alexa Fluor 488

A transfecção das células da linhagem CHO para imunocitoquímica ocorreu conforme o item 4.6.4, porém, antes da montagem da placa, foi depositada uma lamínula no fundo de cada poço para que houvesse crescimento celular na superfície da mesma. Após 48 horas da transfecção das células com o pValac::IL-10 foram confeccionadas lâminas para detecção da proteína IL-10 por imunofluorescência, assim como também para as células transfectadas e tratadas somente com anticorpo secundário (controle negativo do anticorpo secundário), as células transfectadas com o plasmídeo pValac::*gfp* (controle positivo) e as células não transfectadas (controle negativo das células).

Com este propósito foi retirado o meio de cultivo celular de todos os poços e estes lavados 2X com 500 µL de PBS. Em seguida, as células foram fixadas com 300 µL de paraformaldeído a 2% durante 15 minutos sem agitação e lavadas novamente 2X com 500 µL de PBS. A continuação, as células foram permeabilizadas com 300 µL de Triton X-100 0,1% em PBS por 10 minutos. Após lavar as células com 500 µL de PBS, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-IL-10 (Rat monoclonal to IL-10, SantaCruz) na concentração inicial de 0,5 mg/mL diluído 1,5:100 em PBS/BSA 1% (BSA, do inglês, Bovine Serum Albumin). Assim, cada lamínula foi incubada com 100 µL do anticorpo

primário diluído em câmara úmida por 2 horas à temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as lamínulas foram colocadas novamente na placa e lavadas 5X com 500 µL de PBS e agitação bem leve. A continuação, a lamínula foi incubada em câmara úmida por 1 hora a temperatura ambiente e ao abrigo da luz com 100 µL do anticorpo secundário IgG Anti-Rato Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) na concentração inicial de 2 mg/mL diluído 1:500 em PBS/BSA 1%. A marcação nuclear das células foi feita por incubação com DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole - Invitrogen) na concentração final de 2 µg/mL diluído 1:300 em PBS/BSA 1%. Após 4 lavagens com 1 mL de PBS, as lamínulas foram dispostas sobre lâminas com Hydrmount e seladas para observação microscópica.

Todas as lâminas construídas foram visualizadas em um Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss, utilizando a objetiva de 63X com óleo de imersão. Para detecção da fluorescência do Alexa fluor 488, foi utilizado o laser de argônio e o filtro azul com emissão máxima a 520 nm. Para detecção do DAPI foi utilizado a epifluorescência do mesmo microscópio, utilizando o filtro para DAPI com emissão na faixa de 461 nm. A colocalização das imagens com dupla marcação foi realizada pela sobreposição das imagens digitais separadas de cada fluorocromo, sendo estas imagens visualizadas e editadas no programa Zeiss LSM Image Browser.

#### 4.7.4 Ensaio de citometria de Fluxo

Para realizar o ensaio de citometria de fluxo, FACS (do inglês, Fluorescent Activated Cell Sorter) 250.000 células da linhagem CHO foram cultivadas e mantidas para crescimento por 48 horas à 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. No dia da transfecção, as células de três poços foram transfectadas (item 4.6.4) com o nosso plasmídeo de interesse, pValac::IL-10, outros três com o plasmídeo pValac::*gfp* (controle positivo), e como controles negativos do experimento, três poços não foram transfectados e à outros três foi adicionada Lipofectamine™ 2000.

Após 48 h da transfecção foi realizada a marcação da proteína IL-10 utilizando as soluções do *Foxp3 Staining Buffer Set* (eBioscience). Assim foram adicionadas primeiramente em uma placa de 96 wells (placa para FACS), 1x10<sup>6</sup> de células por poço (em triplicata), das células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10, das células transfectadas com o plasmídeo pValac::*gfp*, das células não transfectadas e das células às quais foi adicionada a lipofectamine. Posteriormente, a placa foi centrifugada a 1.200 rpm a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL/poço de Tampão de Fixação. A fixação foi mantida por 30 minutos a 4°C e a continuação, a placa foi novamente centrifugada a 1.200 rpm 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 150 µL/poço de Tampão de

Permeabilização e incubadas por 30 minutos à 37°C ao abrigo da luz. Passado esse tempo, as células foram centrifugadas (1.200 rpm a 4°C por 10 minutos), o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 200 µL/poço de PBS-Wash, novamente centrifugadas (1.200 rpm a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados à cada poço contendo as células CHO transfectadas com o plasmídeo de interesse pValac::IL-10, 10µL do anticorpo primário monoclonal anti-IL-10 (*Rat Anti-IL-10 mouse* – Santa Cruz) na concentração inicial de 1 mg/mL, diluído 1,5:100 em solução de PBS-Wash e às amostras controle foram adicionados 200 µL/poço de PBS 1X. As amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz, lavadas duas vezes com 200 µL/poço de PBS-Wash e centrifugadas (1.200 rpm a 4°C por 10 minutos). Posteriormente, foram adicionados 10 µL/poço do anticorpo secundário IgG anti-rat Alexa-Fluor 488 (Invitrogen) na concentração inicial de 2 mg/mL, diluído 1:500 em PBS-Wash; novamente foram adicionados 200 µL/poço às amostras controle. Após meia hora de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a placa foi centrifugada (1.200 rpm a 4°C por 10 minutos) e o sobrenadante descartado. Para finalizar, as células de cada poço foram ressuspensas com 200 µL de PBS 1X.

A leitura de citometria de fluxo foi realizada usando o citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickison Bioscience) e os dados adquiridos foram analisados pelo programa FlowJo 7.6.4 (Treestar, Ashland, OR).

#### 4.8 Construção de linhagens de *Lactococcus lactis* carreadoras do plasmídeo pValac::IL-10

##### 4.8.1 Confecção de células eletrocompetentes de *L. lactis*

Foram preparadas células eletrocompetentes de *L. lactis* MG1363 (linhagem selvagem) e *L. lactis* MG1363 FnBPA (linhagem invasiva) como se segue. Para preparação de células eletrocompetentes de *L. lactis* MG1363 foi feito um pré-inóculo com 10 µL do estoque de *L. lactis* MG1363 em 5 mL do meio M17 suplementado com Sacarose (0,5 M) e Glicose (0,5%) (M17-Sac-Gli). Este inóculo foi mantido a 30°C, sem agitação, até a manhã seguinte, totalizando-se 20 horas de crescimento. Posteriormente, foi realizado um inóculo com 100 µL dessa primeira cultura em 5 mL do meio M17-Sac-Gli, o qual foi incubado a 30°C, sem agitação, por 8 horas. Uma alíquota de 1 µL desta última cultura foi então inoculada em 200 mL de meio M17-Sac-Gli acrescido de 1% de glicina. Uma vez que a cultura alcançou uma DO<sub>600nm</sub> em torno de 0,4 - 0,6, esta foi centrifugada a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi então ressuspensado em 200 mL de uma solução gelada e estéril constituída de sacarose 0,5 M e glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais quatro vezes e,

após a última lavagem, o precipitado celular foi ressuspenso em 1 mL de uma solução estéril constituída de PEG3000 30% (Polyethylene glycol 3000) e glicerol 10%. Alíquotas de 100 µL dessas células foram estocadas a -70°C até o momento do uso.

O mesmo protocolo foi utilizado para preparação de células eletrocompetentes de *L. lactis* MG1363 FnBPA, com adição 5 µg/mL do antibiótico eritromicina (Ery) (Sigma) nos inóculos.

#### **Meios e Soluções**

**M17-Sac-Gli (M17 sacarose glicose):** 21 g meio de cultivo M17 (Fluka analytical®) foram dissolvidas em água destilada até completar-se 250 mL, sendo que o meio ficou concentrado 2X. A solução de sacarose (PM: 342,3) foi preparada dissolvendo-se 85,5 g desta em água destilada até completar 250 mL, resultando em uma solução 1 M. O meio M17 e a solução de sacarose foram esterelizados, separadamente, à 121°C por 15 minutos e a glicose 50% foi filtrada. Em capela de fluxo laminar, o M17, a sacarose e 5 mL de glicose 50% foram misturados, resultando em M17 1X, Sacarose 0,5 M, Glicose 0,5%.

**Glicina:** a solução estoque 20% de glicina foi preparada diluindo-se 10 g desta em água destilada q.s.p. 50 mL e esterelizada por autoclavação à 121°C por 15 minutos.

**Sacarose 0,5 M e glicerol 10%:** 105 mL de glicerina e 179,5 g de sacarose foram diluídos em água destilada q.s.p. 1,05 L. A mistura foi esterelizada por autoclavação à 121°C por 15 minutos.

**PEG3000 30% e glicerol 10%:** 3 g de PEG3000, 1mL de glicerol e água destilada q.s.p. 10 mL.

#### 4.8.2 Transformação das linhagens de *L. lactis* com o plasmídeo pValac::IL-10

Os plasmídeos extraídos, pValac::IL-10 (item 4.5.7), foram utilizados para a transformação das linhagens de *L. lactis*. Uma alíquota de células eletrocompetentes (item 4.8.1) foi colocada em gelo por 5 minutos e a seguir, 2 µL do plasmídeo pValac::IL-10 (100 ng/µL) foram adicionados às mesmas. O plasmídeo pValac::gfp também foi utilizado para transformação das linhagens de *L. lactis* com a finalidade de utilização da linhagem resultante como um controle positivo em experimentos futuros. As células foram mantidas em contato com o DNA plasmidiano por 5 minutos no gelo e, logo após, foram colocadas em uma cubeta de 0,2 cm para a eletroporação. Após o pulso foi adicionado 1 mL de M17-Sac-Gli às células e a mistura foi mantida por 3 horas a 30°C sem agitação. Para controle negativo foram transformados 100 µL de células eletrocompetentes sem adição de plasmídeo.

A seleção dos transformantes ocorreu em placas M17-Sac-Gli ágar acrescidas de Cm (10 µg/mL) para a linhagem de *L. lactis* MG1363 e de Cm (5 µg/mL) e Ery (2,5 µg/mL) para seleção dos dois plasmídeos presentes na linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA: o recém transformado pValac::IL-10 ou pValac::gfp e o plasmídeo já existente na linhagem, pOri23-fnbA, respectivamente. As placas foram mantidas à 30°C por 24-48 horas e após este período foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes tanto à Cm (*L. lactis*

MG1363) e à Cm e Ery (*L. lactis* MG1363 FnBPA). Posteriormente foram selecionados 5 clones de cada uma das placas para extração plasmidiana e confirmação da presença das ORFs codificadoras de IL-10 ou GFP. Os clones selecionados foram cultivados, as culturas diluídas (1:4) em glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C.

#### 4.8.3 Extração do DNA plasmidiano de *L. lactis*

A extração do DNA plasmidiano será feita das diferentes construções resultantes da transformação de *L. lactis* MG1363 e *L. lactis* FnBPA com o plasmídeo pValac::IL-10 e pValac::gfp. As colônias foram inoculadas em 5 mL de M17-Sac-Gli suplementado com Cm (10 µg/mL) para a linhagem de *L. lactis* MG1363 e suplementado com Cm (5 µg/mL) e Ery (2,5 µg/mL) para a linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA. A cultura foi mantida a 30°C por aproximadamente 18 horas, sem agitação. Para a extração dos plasmídeos, foi utilizado o método de lise alcalina assim como descrito no item 4.4.4, com algumas modificações: após a primeira centrifugação, foram adicionados, ao precipitado celular, 250 µL de TE-Lisozima (TE-LYS). A mistura foi incubada à 37°C por 1 hora. Após este período, seguiu-se normalmente o protocolo (item 4.4.4).

#### **Solução**

**TE-LYS:** TE 0,5X (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl) e 10 mg/mL Lisozima

#### 4.8.4 Confirmação das construções *L. lactis* (pValac::IL-10)

Para confirmar a obtenção de clones das diferentes linhagens de *L. lactis* portadoras dos plasmídeos pValac::IL-10 ou pValac::gfp, os plasmídeos extraídos (item 4.8.3) foram submetidos a uma reação de PCR utilizando os iniciadores descritos na Tabela 7. Os iniciadores FnBPA:FnAF e FnBPA:FnAR foram utilizados somente para detecção do plasmídeo pOri23-fnbA já existente na linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA.

**Tabela 7:** Primers utilizados na reação de PCR da ORF *IL-10*, *gfp* e de parte da ORF *FnBPA*

Iniciador Forward de IL-10: IL-10F <sup>a</sup>	5' – GGATCCACCATGGCTGGCTCAGCACTGCTATGC – 3'
Iniciador Reverse de IL-10: IL-10R <sup>b</sup>	5' – GATATCTTAGCTTTTCATTTTGATCATCAT – 3'
Tamanho do fragmento amplificado	537 pb
Primer Forward do pValac : ValF <sup>c</sup>	5' – GCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGG – 3'
Primer Reverse do pValac : ValR <sup>d</sup>	5' – GCAACTAGAAGGCACAGTCGAGG – 3'
Tamanho do fragmento amplificado	737 pb
Iniciador Forward da FnBPA:FnAF <sup>e</sup>	5' – TCAGCTATTGATATCGATTA – 3'
Iniciador Reverse da FnBPA:FnAR <sup>f</sup>	5' – CAACACTATTGTGTCCACCG – 3'
Tamanho do fragmento amplificado (parte do gene da FnBPA)	807 pb

<sup>a</sup>: Primer Forward da IL-10: O adaptador contém uma sequência de sítio de restrição para a enzima *Bam*HI (sublinhado) e a sequência de Kozak (negrito); Tm: 57°C.

<sup>b</sup>: Primer Reverse da IL-10: O adaptador contém uma sequência de sítio de restrição para a enzima *Eco*RV (sublinhado); Tm: 57°C.

<sup>c</sup>: Primer Forward do vetor pValac: Amplificação a partir de 105 pb anteriores ao sítio de *Bam*HI; Tm: 60°C.

<sup>d</sup>: Primer Reverse do vetor pValac: Amplificação a partir de 87 pb posteriores ao sítio de *Eco*RI; Tm: 60°C.

<sup>e</sup>: Iniciador forward da FnBPA:FnAF<sup>c</sup>: Anelamento dentro da ORF FnBPA; Tm: 50°C

<sup>f</sup>: Iniciador reverse da FnBPA:FnAR<sup>f</sup>: Anelamento dentro da ORF FnBPA; Tm: 50°C

Assim, cada clone foi submetido a uma reação de PCR nas seguintes condições: 2 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega); 1 µL de dNTP 10 mM; 0,5 µL do *primer forward* IL-10 e 0,5 µL do *primer reverse* IL-10, ambos a 100 pmol/µL; 0,5 µL do DNA (100 ng/µL); 0,3 µL da enzima DNA polimerase Go Taq<sup>®</sup> 5 U/µL (Promega); 15,2 µL de água milli-Q estéril, totalizando um volume final de 25 µL. Não foi acrescentado DNA ao controle negativo das reações. As reações ocorreram nas condições descritas na Tabela 8.

**Tabela 8:** Condições de PCR para confirmação dos clones de *L. lactis* portadores do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10

Estágio	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Primeira desnaturação	94	7 minutos	
Desnaturação	94	30 segundos	} 30
Anelamento	X <sup>a</sup>	30 segundos	
Extensão	72	1,5 minutos	
Extensão final	72	7 minutos	

<sup>a</sup>: Temperatura de anelamento variável para cada iniciador específico: IL-10F e IL-10R: 57°C; ValF e ValR: 60°C; FnBPA:FnAF e FnBPA:FnAR: 50°C.

#### 4.9 Ensaio-piloto em camundongos com IBD experimental

Para o ensaio-piloto *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas (Melgar *et al.*, 2007) com um peso de aproximadamente 18 a 20 g, alcançável entre a 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana de idade. Os grupos experimentais foram ajustados em relação aos pesos dos animais, para obtenção de resultados mais homogêneos e cada grupo foi formado por 5 animais.

##### 4.9.1 Indução da IBD experimental

A colite ulcerativa foi induzida quimicamente por DSS, diluído 1,5% em água mineral, e cada animal recebeu aproximadamente 5 mL desta solução por dia, como única fonte líquida. A administração foi feita utilizando mamadeira por 7 dias consecutivos, sendo um ciclo suficiente para obtenção da colite experimental.

##### 4.9.1.2 Administração de linhagens de *L. lactis* recombinantes

###### 4.9.1.2.1 Tratamento da IBD experimental

Os grupos experimentais para avaliação do tratamento da IBD experimental foram os seguintes:

i) Água: animais que receberam apenas água durante todo o experimento;

ii) DSS: animais que receberam DSS 1,5% durante os primeiros 7 dias e meio M17-Gli nos 7 dias seguintes;

iii) *L. lactis* MG1363 FnBPA+: animais que receberam DSS 1,5% durante os primeiros 7 dias e a linhagem invasiva *L. lactis* MG1363 FnBPA+ em meio M17-Gli nos 7 dias seguintes;

iv) *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10): animais que receberam DSS 1,5% durante os primeiros 7 dias e a linhagem invasiva portadora do plasmídeo pValac::IL-10 *L. lactis* MG1363 FnBPA+(pValac::IL-10) em meio M17-Gli nos 7 dias seguintes;

v) *L. lactis* MG1363: animais que receberam DSS 1,5% durante os primeiros 7 dias e a linhagem selvagem *L. lactis* MG1363 em meio M17-Gli nos 7 dias seguintes; e

vi) *L. lactis* MG1363 (pValac::IL-10): animais que receberam DSS 1,5% durante os primeiros 7 dias e a linhagem selvagem portadora do plasmídeo pValac::IL-10 *L. lactis* MG1363 em meio M17-Gli nos 7 dias seguintes.

As linhagens recombinantes de *L. lactis* foram crescidas em meio M17-Gli com o antibiótico necessário para cada uma - e cada camundongo recebeu  $10^9$  bactérias/mL (UFC) por dia (5 mL/dia) por mamadeira durante 7 dias consecutivos. E o grupo controle recebeu somente água.

No 14º dia do experimento, na eutanásia, retiramos o baço, intestino delgado, o sangue e coletamos amostras de fezes de cada animal. Posteriormente, o cólon foi removido e dividido em partes. A porção descendente do cólon (aproximadamente 1 cm) foi fixado em formalina e reservada para histologia. O restante foi congelado a  $-80$  °C para dosagem de citocinas. Os animais também foram avaliados quanto ao tamanho do cólon, presença ou ausência de diarreia e/ou sangramento retal.

#### 4.9.2 Aspectos bioéticos e de biossegurança

##### 4.9.2.1 Bioética

Os animais foram mantidos em isoladores específicos para animais com temperatura, umidade, fluxo de ar, ciclo de luz clara/obscura controlado e com livre acesso a água e ração. Os procedimentos e as manipulações dos animais foram efetuados segundo as normas dos comitês de ética em pesquisa do ICB/UFMG. O protocolo da Comissão de Ética



no Uso de Animais (CEUA) da UFMG para a utilização de animais em experimentação encontra-se sob o número 66/2011.

#### 4.9.2.2 Biossegurança

As devidas precauções de biossegurança foram tomadas de acordo com normas e regulamentos estipulados e exigidos pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da UFMG.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

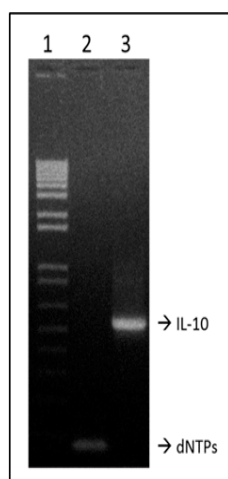
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Construção do plasmídeo pValac::IL-10

O primeiro passo deste trabalho consistiu no isolamento, por PCR, do fragmento de DNA, de 537 pb, contendo a sequência codificadora da IL-10 de *Mus musculus*, utilizando como molde o plasmídeo pJ201 (Tabela 1) o qual possui a ORF de IL-10 de *M. musculus*. A presença de sítios artificiais de restrição (*Bam*HI e *Eco*RV) nos pares de iniciadores (Tabela 2) foram utilizados para que a ORF IL-10 pudesse ser clonada de forma direcionada e na fase de leitura correta no vetor pValac.

#### 5.1.1 Amplificação da ORF IL-10

Para a reação de amplificação da ORF IL-10, foi utilizada a enzima DNA polimerase Pfx PlatinumR (Invitrogen), cuja atividade é altamente estável, de alta especificidade e precisão, sendo ideal para amplificações, por PCR, que requerem taxas mínimas de mutações (inserções, deleções ou trocas) durante a incorporação de nucleotídeos. Após a reação de PCR, foi verificada a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 537 pb, assim como esperado para a ORF IL-10 de *M. musculus* e além disso, não foi observado qualquer produto de amplificação no controle negativo (Figura 7).



**Figura 7:** Amplificação, por PCR, da ORF IL-10 de *Mus musculus*. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. Análise do produto de amplificação: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação; Canaleta 3: Produto da amplificação – IL-10.

### 5.1.2 Clonagem da ORF IL-10 no sistema TOPO

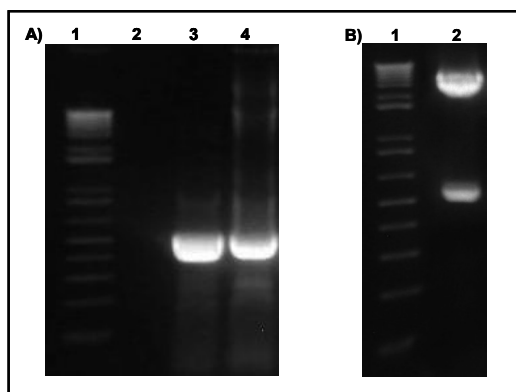
O fragmento amplificado no item 5.1.1, correspondente a sequência codificadora da IL-10 de *M. musculus*, foi clonada no vetor Zero Blunt® TOPO®, um vetor linear que apresenta a topoisomerase I do vírus *Vaccinia* ligada, covalentemente, à extremidade 3' fosfato de cada fita de DNA. A ligação entre a topoisomerase I e o DNA do vetor é capaz de fornecer energia para a ligação do inserto, liberando então a enzima.

Desta forma obteve-se o plasmídeo pTOPO::IL-10. A geração deste “plasmídeo intermediário” foi necessária, haja vista que a digestão enzimática do mesmo levaria à liberação do inserto, neste caso, a ORF IL-10, com extremidades coesivas, as quais permitirão que o mesmo seja clonado de forma direcionada e em fase de leitura correta no vetor de expressão eucariótica, pValac.

Este plasmídeo foi então utilizado para transformar células de *E. coli* TG1 eletrocompetentes. Aproximadamente 18 horas após a transformação, foi possível a visualização de colônias recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde, também, nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

Dez colônias transformadas foram escolhidas de forma aleatória, inoculadas em meio líquido seletivo e incubadas à 37°C por 18 horas. Essas culturas foram então individualmente estocadas em glicerol para uma posterior confirmação da presença do plasmídeo pTOPO::IL-10.

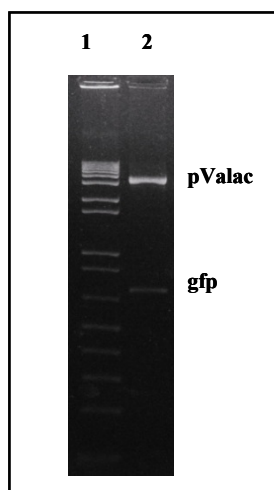
O DNA plasmidiano extraído foi então utilizado como molde para confirmar a clonagem do inserto através de uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos para a ORF IL-10 de *M. musculus*. Todos os clones foram confirmados como sendo portadores do inserto correspondente à ORF IL-10 (537 pb). A figura 8A mostra um dos produtos de amplificação da ORF IL-10 obtidos a partir do DNA plasmidiano proveniente de um dos clones escolhidos aleatoriamente. O controle negativo da reação, no qual utilizou-se água milli-Q estéril ao invés de DNA molde, não demonstrou qualquer sinal de amplificação e o plasmídeo pJ201 foi utilizado como controle positivo da reação (Figura 8A). Além disto, o pTOPO::IL-10 foi submetido a uma reação de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RV; o que resultou em dois fragmentos visíveis: um de aproximadamente 537 pb, correspondente à ORF IL-10 e outro de 3.470 pb, correspondente ao vetor Zero Blunt® TOPO® (Figura 8B). Sendo assim, estes dados confirmaram a obtenção do plasmídeo pTOPO::IL-10.



**Figura 8:** Amplificação, por PCR, da ORF IL-10 de *M. musculus* e digestão enzimática a partir do DNA plasmidiano extraído de células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pTOPO::IL-10. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. **8A)** Amplificação da ORF IL-10. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da PCR. Canaleta 3: Controle positivo da PCR utilizando-se o plasmídeo pJ201. Canaleta 4: Inseto IL-10 amplificado por PCR a partir do DNA plasmidiano extraído de um dos clones de *E. coli* TG1. **8B)** Digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RV. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da digestão enzimática, resultando nos fragmentos visíveis de 537 pb e 3.470 pb, correspondentes à ORF IL-10 e ao vetor Zero Blunt® TOPO®, respectivamente.

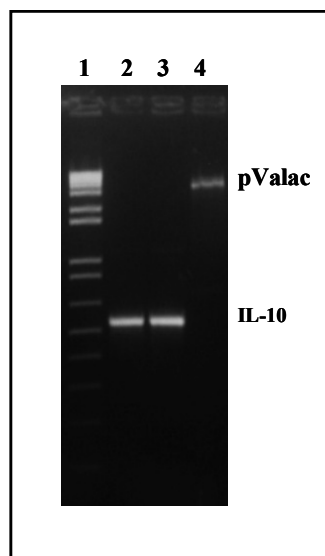
### 5.1.3 Clonagem da ORF IL-10 no vetor pValac

O plasmídeo de expressão eucariótica pValac::*gfp* (Guimaraes *et al.*, 2009) foi extraído de *E. coli* e submetido a uma reação de digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RV para a liberação da ORF *gfp* (696 pb) do vetor pValac. (Figura 9).



**Figura 9:** Análise do produto de digestão enzimática do pValac::*gfp*. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2: Produto da reação de digestão enzimática do pValac::*gfp*, utilizando-se as endonucleases *Eco*RV e *Bam*HI, resultando em um fragmento de 3.719 pb (pValac) e 696 pb (*gfp*).

Simultaneamente, a ORF IL-10, também com extremidades coesivas *Bam*HI e *Eco*RV, foi purificada a partir da digestão do plasmídeo pTOPO::IL-10, para posterior ligação ao vetor pValac purificado (Figura 10).

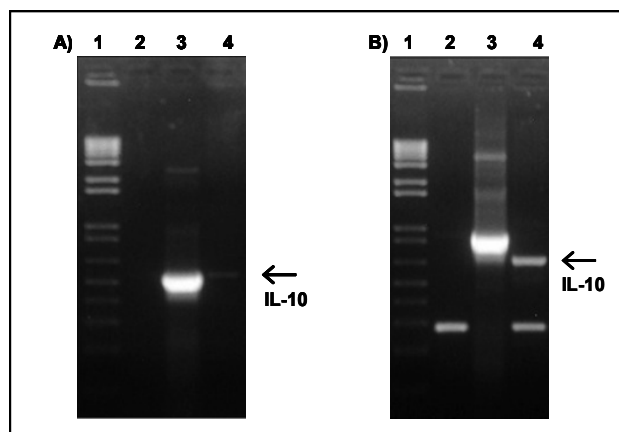


**Figura 10:** Análise dos produtos IL-10 e pValac purificados. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 2 e 3: Produto da purificação da ORF IL-10 a partir da digestão enzimática do pTOPO::IL-10. Canaleta 4: Produto da purificação do pValac (3.719 pb) a partir da digestão enzimática do pValac::gfp.

Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1. A seleção de colônias de *E. coli* transformadas com esses plasmídeos foi realizada em meio LB ágar contendo 10 µg/mL de clorafenicol. Após 18 horas da transformação foram visualizadas colônias resistentes ao antibiótico. Foram inoculadas 10 colônias em meio líquido seletivo e incubadas à 37°C por aproximadamente 18 horas.

Após este período, todos os clones demonstraram crescimento e foram estocados em glicerol para posterior extração dos plasmídeos recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

Os DNAs plasmídicos extraídos foram então utilizados como molde numa reação de PCR, utilizando os iniciadores específicos da ORF IL-10 de *M. musculus*, para confirmar a presença do inserto no pValac. Além disso, os mesmos plasmídeos também foram utilizados como molde numa reação de PCR, utilizando os iniciadores específicos do vetor pValac. Todos os DNAs plasmídicos foram confirmados como sendo portadores do inserto correspondente à ORF IL-10 utilizando tanto os iniciadores específicos da ORF IL-10 de *M. musculus* quanto do pValac (Figura 11). A figura 11A mostra os produtos de amplificação da ORF IL-10. Como esperado, não foi observado qualquer produto de amplificação no controle negativo. Para o controle positivo da reação de PCR utilizando os iniciadores específicos da ORF IL-10 foi utilizado o plasmídeo pJ201 que contém a sequência codificadora da IL-10 de *M. musculus*, enquanto que o pValac::gfp foi utilizado para o controle positivo da reação de PCR utilizando os iniciadores específicos do vetor pValac (Figura 11B).



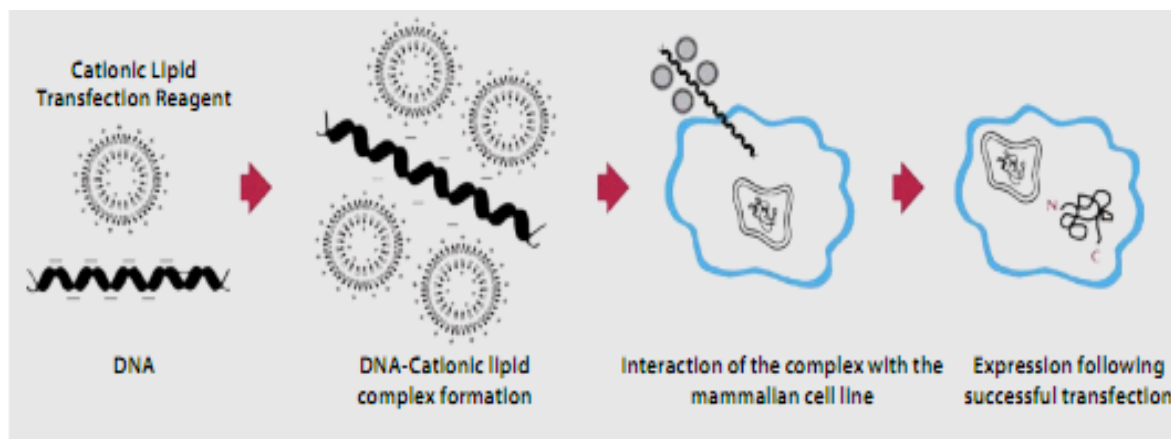
**Figura 11:** Confirmação da presença, por PCR, da ORF IL-10 no vetor pValac. Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. **A)** Confirmação da presença, por PCR, da construção pValac::IL-10 utilizando os primers específicos da ORF IL-10. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2: Controle negativo da reação. Canaleta 3: Controle positivo da reação utilizando o plasmídeo pJ201. Canaleta 4: Amplificação da ORF IL-10. **B)** Confirmação da presença, por PCR, da construção pValac::IL-10 utilizando os primers específicos do vetor pValac. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2: Controle negativo da reação. Canaleta 3: Controle positivo da reação utilizando o plasmídeo pValac::*gfp*. Canaleta 4: Amplificação da ORF IL-10.

## 5.2 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac::IL-10 em cultura de células

Uma vez obtida e confirmada a construção do plasmídeo pValac::IL-10, a segunda parte deste trabalho consistiu na verificação e avaliação da funcionalidade do mesmo. Desta maneira, a funcionalidade do plasmídeo pValac::IL-10 foi testada, *in vitro*, na linhagem celular mamífera Flp-In<sup>TM</sup>-CHO (Invitrogen), uma vez que este plasmídeo possui um *cassete* de expressão eucariótico, e assim foram realizados experimentos para detecção da expressão e presença da proteína IL-10 por Western Blot, ELISA, Imunocitoquímica e FACS.

### 5.2.1 Transfecção de células da linhagem Flp-In<sup>TM</sup>-CHO

Células da linhagem CHO foram transfectadas com o reagente lipossômico Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen), para entrega dos plasmídeos de interesse as próprias células. O princípio de entrega de DNA utilizando lipofectamina consiste na ligação espontânea do DNA (carregado negativamente) ao lipossomo (carregado positivamente) levando à formação de um complexo DNA-reagente lipossômico. Uma vez formado o complexo, este entra nas células por endocitose e atinge o núcleo para expressão gênica. O mecanismo de entrega de DNA em células pode ser visualizado na Figura 12.

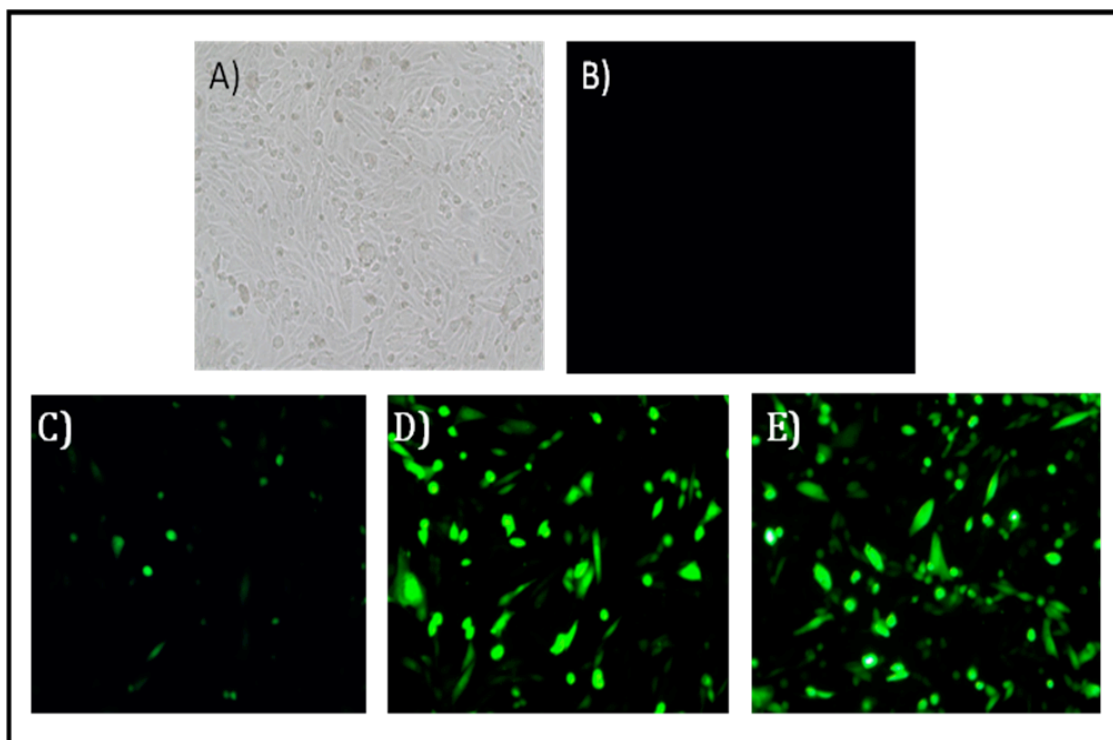


**Figura 12:** Mecanismo proposto para entrada do DNA nas células. Utilização de Lipofectamine 2000 para entrega de DNA à células hospedeiras, através da formação de um complexo DNA-reagente lipossômico (Adaptado de Invitrogen, [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

### 5.2.2 Padronização da transfecção celular com o plasmídeo pValac::*gfp*

Para a padronização da transfecção celular foi utilizado como controle positivo o plasmídeo pValac::*gfp* e foram testados diferentes condições visando a otimização do experimento. Para tanto, o reagente Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 foi testada nas proporções “DNA( $\mu$ g):Lipofectamine( $\mu$ L)”de: 1:2, 1:2,5 e 1:3, sendo verificado visualmente, por microscopia de fluorescência, que a melhor condição obtida foi na proporção 1:3 de DNA(4  $\mu$ g):Lipofectamine(12  $\mu$ L). Além disso, a avaliação das células transfectadas foi feita nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-transfecção, tendo os melhores níveis de expressão de GFP sido observados no intervalo entre 48 e 72 horas (Figura 13D e 13E). A outra condição testada foi a de não trocar o meio de cultura após 4 horas da transfecção ou trocá-lo pelo mesmo meio, porém, acrescido da suspensão de antibiótico e antimicótico. O resultado deste último teste foi que a condição “sem trocar o meio” levou à melhor expressão da ORF GFP.



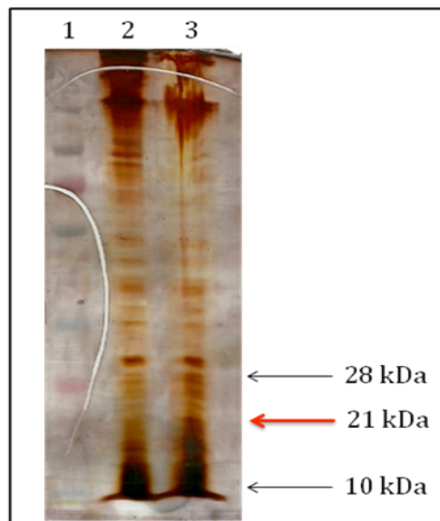


**Figura 13:** Padronização da transfecção das células Flp-In<sup>TM</sup>-CHO (Invitrogen) com o plasmídeo pValac::gfp. **A)** Campo claro de células da linhagem CHO; **B)** Células CHO não transfectadas com 48h; **C)** Células transfectadas com pValac::gfp na proporção de DNA ( $\mu\text{g}$ ):Lipofectamine ( $\mu\text{L}$ ) de 1:3 após 24 horas da transfecção; **D)** Células transfectadas com pValac::gfp na proporção de DNA ( $\mu\text{g}$ ):Lipofectamine ( $\mu\text{L}$ ) de 1:3, após 48 horas da transfecção; **E)** Células transfectadas com pValac::gfp na proporção de DNA ( $\mu\text{g}$ ):Lipofectamine ( $\mu\text{L}$ ) de 1:3 após 72 horas da transfecção. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 20X e filtro azul (exceto campo claro) em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200.

### 5.2.3 Verificação da produção de IL-10 por Western Blotting

Para verificar a capacidade de expressão da proteína IL-10 em células da linhagem CHO, foi feita a extração protéica, após 48 horas, tanto das células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10 quanto das células não transfectadas (controle negativo), e estas foram analisadas em SDS-PAGE.

Através de análises por SDS-PAGE utilizando o método de coloração por Prata para visualização das proteínas totais no gel, foi possível verificar e confirmar a boa qualidade da extração protéica e das mesmas proteínas. Como esperado, também foi possível visualizar um fragmento polipeptídico mais forte na altura do peso molecular esperado de 21KDa para IL-10. Porém, a diferença entre os extratos protéicos das culturas celulares transfectadas quanto das não transfectadas (Figura 14) não foi muito significativa, provavelmente devido a baixa produção da IL-10 por células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10.



**Figura 14:** Análise do extrato protéico de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10 corado com Nitrato de Prata. Canaleta 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas); Canaleta 2: Extrato protéico de células CHO não transfectadas (controle negativo); Canaleta 3: Extrato protéico de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10.

Neste contexto, foram feitas análises de imunodeteção por Western Blot utilizando o anticorpo primário monoclonal anti-IL-10 e o anticorpo secundário ligado a peroxidase, após análise dos extratos protéicos em gel de poliacrilamida e transferência destes para membranas de PVDF para posterior imunodeteção. Foi possível identificar um fragmento polipeptídico na altura do peso molecular esperado (21 KDa) para IL-10, porém, a intensidade foi muito fraca; o que por conseguinte não permitiu que a imunodeteção fosse digitalizada.

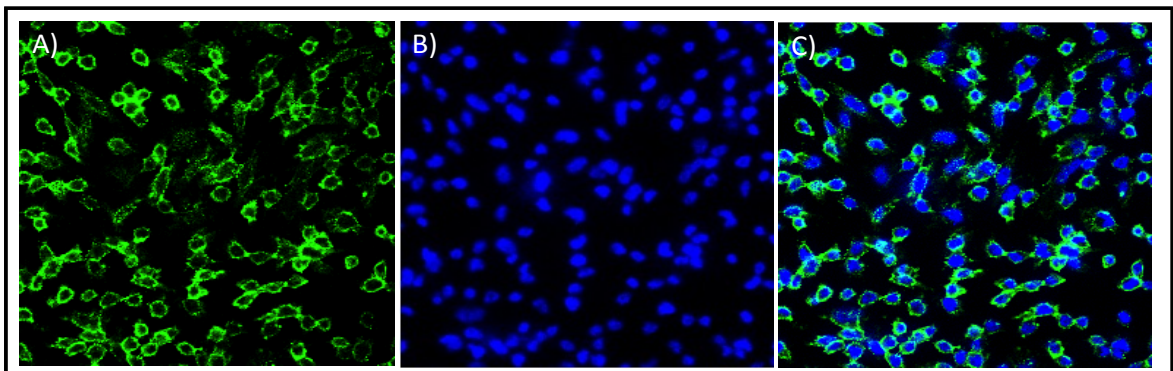
#### 5.2.4 Verificação da produção de IL-10 por Ensaio imunoenzimático – ELISA

Como os resultados obtidos e mencionados no item 5.2.3 não foram conclusivos, seguiu-se com experimentos de ELISA para verificar a capacidade de expressão da proteína IL-10 em células da linhagem CHO. A mesma foi feita a partir da extração protéica, após 48 horas, das células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10 quanto das células não transfectadas (controle negativo), e estas foram analisadas por ELISA. Porém, os níveis da IL-10 detectados não foram significativos.

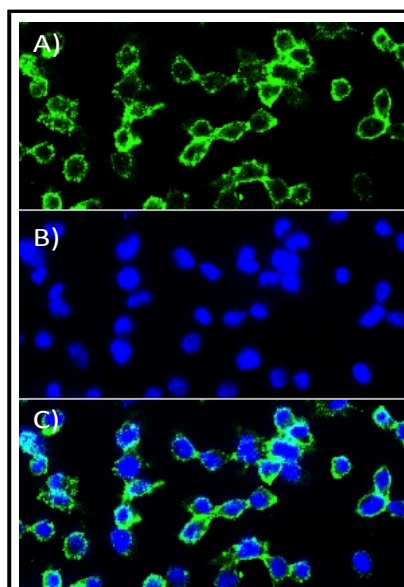
#### 5.2.5 Verificação da produção de IL-10 por Imunocitoquímica - Marcação com Alexa 488

Outra metodologia empregada neste trabalho para confirmar a produção por células da linhagem CHO da IL-10 de *M. musculus* foi a técnica de imunocitoquímica através da marcação da IL-10 com Alexa 488 para posterior visualização e análise em Microscopia Confocal. Para tanto, foi realizado a marcação das proteínas recombinantes com o anticorpo

primário monoclonal (anti-IL-10) e o anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 488. Como pode ser observado nas figuras 15 e 16 (em plano com zoom), foi possível verificar a presença da proteína recombinante após 48 horas da transfecção das células com o plasmídeo pValac::IL-10. Através da sobreposição das imagens (Figura 15A e 15B; 16A e 16B), resultando nas figuras 15C e 16C, pode-se visualizar a marcação da proteína IL-10 com Alexa Fluor 488 em verde e do núcleo marcado com DAPI em azul. Além do mais, pode ser observado que quase todas as células expressam IL-10, indicando que a transfecção celular foi eficiente. Com estes resultados foi possível confirmar a expressão da proteína IL-10 em células transfectadas e consequentemente a funcionalidade do plasmídeo pValac::IL-10 em células eucarióticas.



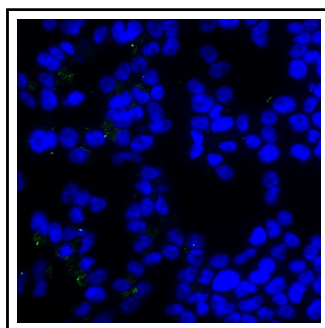
**Figura 15:** Verificação da produção de IL-10 por Imunocitoquímica utilizando Microscopia Confocal. **A)** Células CHO transfectadas com pValac::IL-10 incubadas com DAPI para marcação nuclear e anticorpo secundário Alexa Fluor 488, capturando apenas o Alexa Fluor 488; **B)** Células CHO transfectadas com pValac::IL-10 incubadas com DAPI para marcação nuclear, anticorpo primário anti-IL-10 e anticorpo secundário Alexa Fluor 488, capturando apenas o DAPI; **C)** Sobreposição das imagens A e B, onde se pode visualizar a marcação da proteína IL-10 com Alexa Fluor 488 e do núcleo com DAPI. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 63X com óleo de imersão, utilizando o Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss.



**Figura 16:** Verificação da produção de IL-10 por Imunocitoquímica utilizando Microscopia Confocal em plano com zoom. **A)** Células CHO transfectadas com pValac::IL-10 incubadas com DAPI para

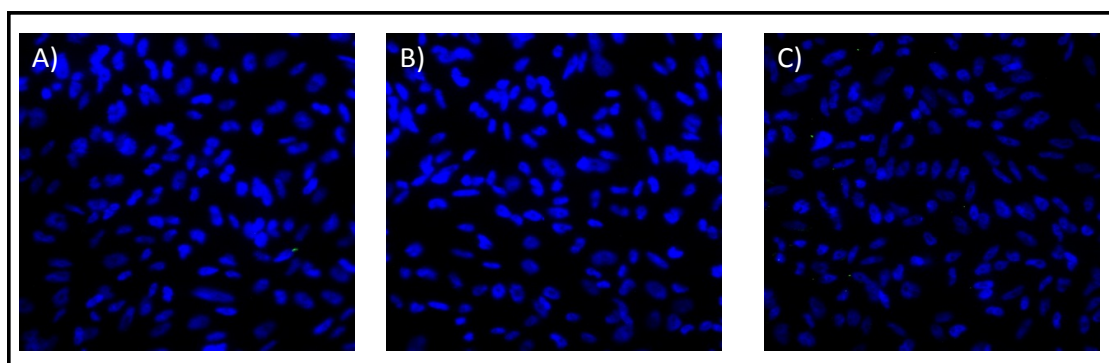
marcação nuclear e anticorpo secundário Alexa Fluor 488, capturando apenas o Alexa Fluor 488; **B)** Células CHO transfectadas com pValac::IL-10 incubadas com DAPI para marcação nuclear, anticorpo primário anti-IL-10 e anticorpo secundário Alexa Fluor 488, capturando apenas o DAPI; **C)** Sobreposição das imagens A e B, onde se pode visualizar a marcação da proteína IL-10 com Alexa Fluor 488 e do núcleo com DAPI. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 63X com óleo de imersão, utilizando o Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss.

Como controle negativo do anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e para verificar que não houve marcação cruzada ou inespecífica, células da linhagem CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10 foram incubadas com DAPI e o anticorpo secundário. Foi possível confirmar que não houve marcação cruzada ou inespecífica do anticorpo secundário Alexa Fluor 488, pois como esperado, apenas foi observada a marcação do núcleo com DAPI em azul (Figura 17).



**Figura 17:** Controle negativo do anticorpo secundário Alexa Fluor 488. Células CHO transfectadas com pValac::IL-10 incubadas com DAPI para marcação nuclear e o anticorpo secundário Alexa Fluor 488. A imagem foi obtida em objetiva de 63X com óleo de imersão, utilizando o Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss.

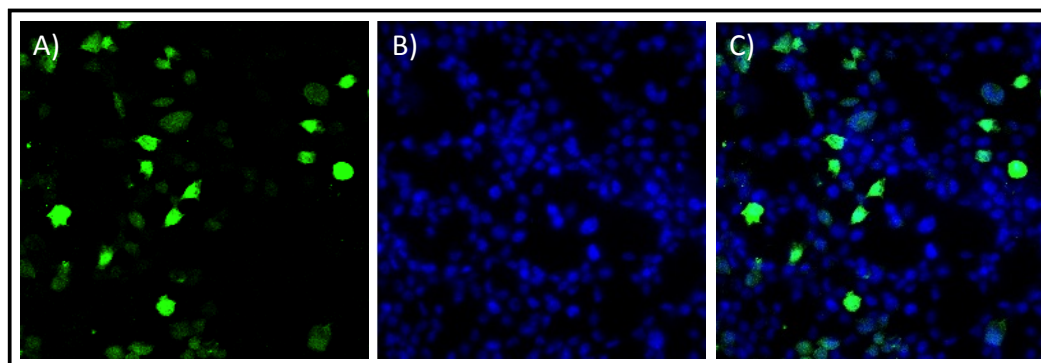
Como controles negativos do experimento, células CHO não transfectadas foram incubadas com DAPI, para marcação nuclear (Figura 18A); com DAPI, para marcação nuclear, e anticorpo secundário Alexa Fluor 488, para verificar que não houve marcação cruzada ou inespecífica (Figura 18B); e com DAPI, para marcação nuclear, anticorpo primário monoclonal (anti-IL-10) e anticorpo secundário Alexa Fluor 488, para verificar novamente que não houve marcação cruzada ou inespecífica (Figura 18C).



**Figura 18:** Controles negativos. **A)** Células CHO não transfectadas incubadas com DAPI para marcação nuclear; **B)** Células CHO não transfectadas incubadas com DAPI para marcação nuclear e o anticorpo secundário Alexa Fluor 488; **C)** Células CHO não transfectadas incubadas com DAPI para marcação nuclear, anticorpo primário anti-IL-10 e anticorpo secundário Alexa Fluor 488. Todas as

imagens foram obtidas em objetiva de 63X com óleo de imersão, utilizando o Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss.

Como controle positivo do experimento foram transfectadas células CHO com o plasmídeo pValac::*gfp* e a expressão e produção da GFP foi verificada por imunocitoquímica utilizando microscopia confocal (Figura 19).



**Figura 19:** Verificação da produção de GFP por Imunocitoquímica utilizando Microscopia Confocal. A) Células CHO transfectadas com pValac::*gfp* incubadas com DAPI para marcação nuclear, capturando apenas a GFP; B) Células CHO transfectadas com pValac::*gfp* incubadas com DAPI para marcação nuclear, capturando apenas o DAPI. C) Sobreposição das imagens A e B, onde se pode visualizar a fluorescência da proteína GFP. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 63X com óleo de imersão, utilizando o Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss.

#### 5.2.6 Verificação da produção de IL-10 por Ensaio de citometria de Fluxo – FACS

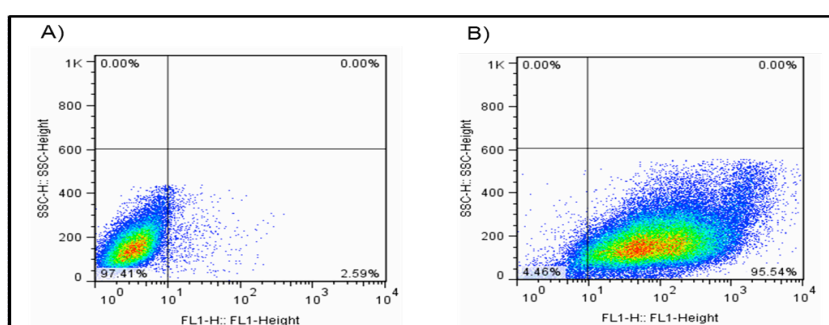
Para analisar a produção e expressão da proteína IL-10 de *M. musculus* através da metodologia de FACS, foram transfectadas células CHO com o plasmídeo pValac::IL-10, e, após 48 horas, foi feita a marcação com o anticorpo primário monoclonal (anti-IL-10) e o anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor 488. Como controle positivo do experimento, para verificar que a transfecção celular foi eficiente, células CHO foram transfectadas com o plasmídeo pValac::*gfp*; como controle negativo foram utilizadas células não transfectadas.

Para cada amostra foram avaliadas cerca de 30.000 células (ou eventos) que foram automaticamente plotados em um gráfico de dispersão de pontos, conhecido como *dot plot*, com base em seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), além de ser gerado também um histograma que reflete os parâmetros SSC/FL-1, ou seja, o nível de fluorescência exibido por cada evento. Posteriormente, com auxílio do programa *FlowJo 7.6.4*, foi delimitada uma região, dentro dos eventos totais, abrangendo apenas a população mais homogênea e excluindo eventos com padrões diversificados onde se encontram células mortas, restos celulares ou mais de uma célula por evento. Esta região foi selecionada (“gated”) e utilizada para obtenção de uma análise mais acurada da expressão gênica, a região de população celular com base no FL1 (Fluorescência específica - espectro de emissão do Alexa Fluor

488) e SSC (Side scatter – granulidade celular). Dessa forma, foram gerados dados referentes a porcentagem de células positivas para expressão de GFP (controle positivo) ou IL-10, bem como a intensidade de fluorescência exibida pelas células, dado fornecido como um valor de mediana. Como medida para análise foram selecionados 98% dos eventos lidos.

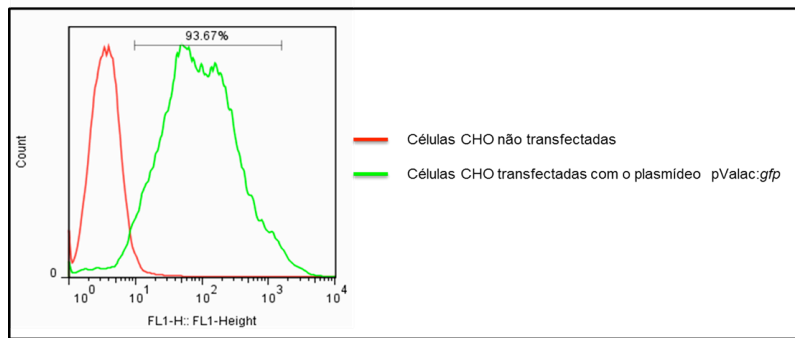
Para poder comparar a expressão entre as células CHO não transfectadas e as células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::*gfp* ou pValac::IL-10, foram primeiramente analisadas as células não transfectadas. Como pode ser observado na figura 17, que mostra o resultado expresso em *dot plot* [SSC (granulidade)/FL1 (fluorescência específica)], as células CHO não transfectadas apresentaram uma parcela de eventos de apenas 2,59% (Figura 20A), enquanto a percentagem de células sem expressão representou 97,41%, o qual é esperado para células não transfectadas.

Posteriormente foi verificada a eficiência de transfecção das células CHO com o plasmídeo pValac::*gfp* e a subsequente expressão do GFP pelas mesmas. Como mostra o *dot plot* representado na figura 20B, a expressão do GFP pelas células CHO foi de 95,54%, com uma intensidade mediana de fluorescência de 96,93, o que significa que a maioria das células CHO expressou uma quantidade muito alta de GFP.



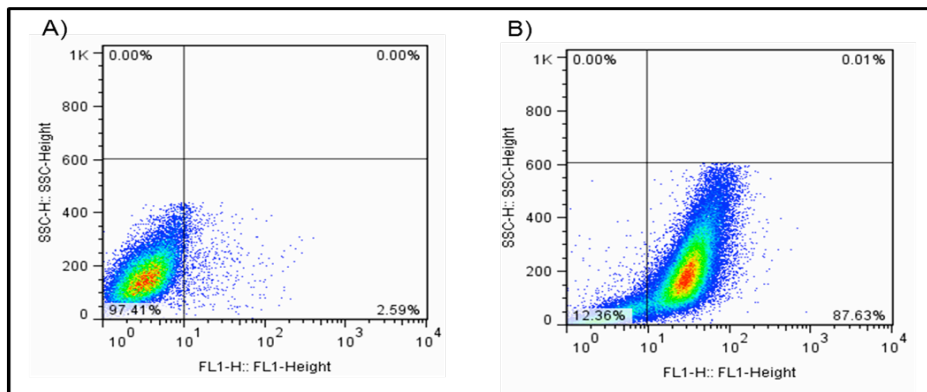
**Figura 20:** Detecção da produção da proteína verde fluorescente (GFP) por células CHO. *Dot plot* gerado pelo programa FlowJo. **A)** Células CHO não transfectadas; **B)** Células CHO expressando a GFP após 48 horas da transfecção com o plasmídeo pValac::*gfp*.

A combinação dos resultados obtidos entre as células CHO não transfectadas e as células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::*gfp* está apresentado na figura 21 em um histograma (Count (quantidade de eventos lidos)/FL1 (fluorescência específica)). Pode ser observado um deslocamento a direita da curva representante das células expressando o GFP, demonstrando que 93,67% corresponde as células eficientemente transfectadas com o plasmídeo pValac::*gfp* que estão produzindo a proteína GFP.



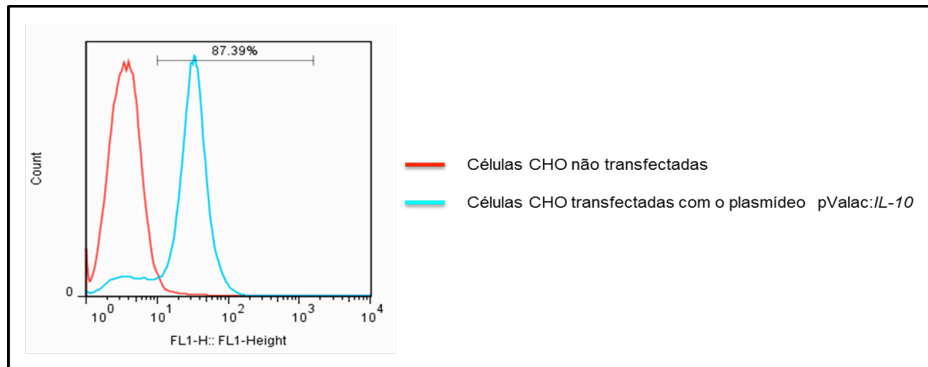
**Figura 21:** Detecção da produção da proteína verde fluorescente (GFP) por células CHO. Histograma gerado pelo programa FlowJo. Histograma contendo a combinação de resultados obtidos entre as células CHO não transfectadas e transfectadas com o plasmídeo pValac:gfp.

Uma vez analisados os dados obtidos tanto para o controle negativo quanto para o controle positivo do experimento, foi possível analisar e avaliar a expressão da proteína IL-10 de *M. musculus* pelas células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:IL-10. Pode ser observado na figura 22 que 87,63% das células expressaram a proteína de interesse, IL-10, com uma intensidade mediana de fluorescência de 34,55. Isto significa que enquanto quase todas as células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:IL-10 expressaram a proteína recombinante, a quantidade expressa foi muito baixa, quando comparado com a produção do GFP pelas células CHO após transfecção com o plasmídeo pValac:gfp.



**Figura 22:** Detecção da produção de IL-10 por células CHO. Dot-plot gerado pelo programa FlowJo. **A)** Células CHO não transfectadas; **B)** Células CHO expressando a IL-10 de *M. musculus* após 48 horas da transfecção com o plasmídeo pValac:IL-10.

Por outro lado, a figura 23 mostra o histograma da combinação de células CHO não transfectadas e as células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:IL-10. Novamente, foi possível observar um deslocamento da curva representando as células eficientemente transfectadas e produtoras da proteína recombinante IL-10 a direita, com uma porcentagem de 87,39%.



**Figura 23:** Detecção da produção de IL-10 por células CHO. Histograma gerado pelo programa FlowJo. Histograma contendo a combinação de resultados obtidos entre as células CHO não transfectadas e transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10.

Estes resultados confirmam a funcionalidade do plasmídeo pValac::IL-10 e a expressão da proteína recombinante IL-10 de *M. musculus* por células da linhagem CHO, no entanto revelam que a produção de IL-10 em cada célula é baixa.

### 5.3 Construção de linhagens de *L. lactis* carreadoras do plasmídeo pValac::IL-10

#### 5.3.1 Obtenção das linhagens *L. lactis* pValac::IL-10

Uma vez confirmada a construção e funcionalidade, *in vitro*, do plasmídeo pValac::IL-10, através das metodologias de Microscopia Confocal e FACS, este foi transferido para as linhagens de *L. lactis*: MG1363 (linhagem selvagem) e MG1363 FnBPA+ (linhagem invasiva) (Tabela 1); o que conseqüentemente resultou na construção de duas linhagens recombinantes de *L. lactis* que, posteriormente, foram utilizadas no ensaio-piloto *in vivo*.

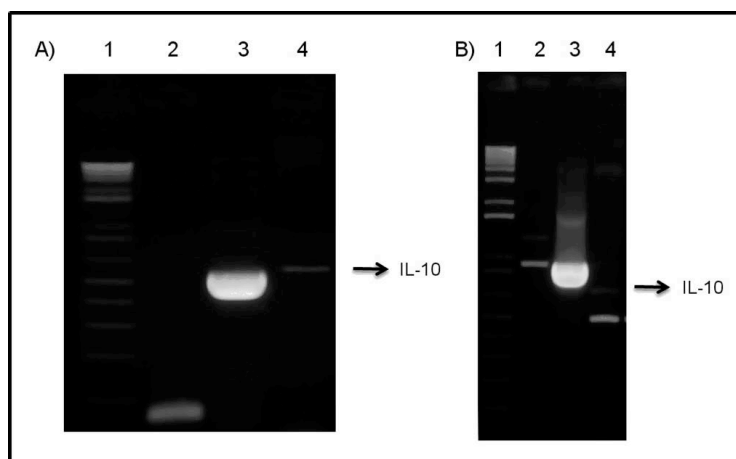
#### 5.3.2 Confirmação das construções *L. lactis* pValac::IL-10

Após a transformação das diferentes linhagens de *L. lactis* foi feita a seleção de colônias recombinantes em meio M17-Gli suplementado com Cm, para *L. lactis* MG1363, ou com Cm e Ery, para *L. lactis* MG1363 FnBPA+, para seleção do plasmídeo pValac::IL-10 e do plasmídeo pOri23:FnbpA, respectivamente. Após 24 horas de crescimento em estufa à 30°C, foram visualizadas e isoladas varias colônias das duas linhagens de *L. lactis* como possíveis portadoras do plasmídeo pValac::IL-10 e estas foram inoculadas em meio líquido seletivo. As culturas de cada possível clone foram estocadas a -80°C e submetidas aos processos de extração do DNA plasmidiano (item 4.8.3).



Para confirmação dos possíveis clones obtidos na linhagem de *L. lactis* MG1363, os plasmídeos extraídos foram submetidos a uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos para a ORF IL-10 e para o vetor pValac (Tabela 7).

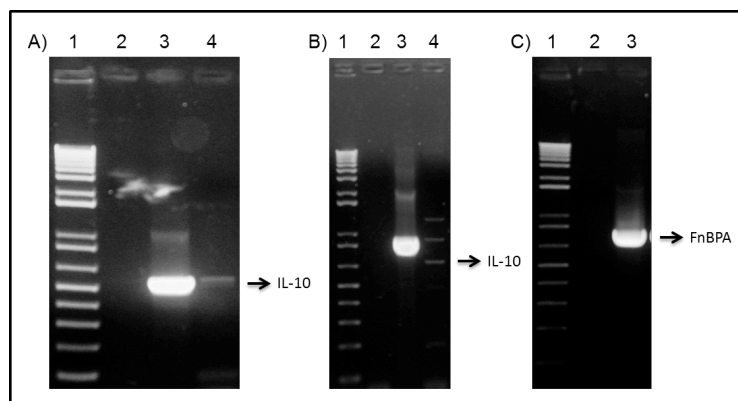
Como pode ser observado na figura 24, a partir da reação de PCR foi possível verificar a presença do plasmídeo pValac::IL-10, utilizando tanto os iniciadores específicos para a ORF IL-10 (Figura 24A), amplificando 537 pb, quanto utilizando os iniciadores específicos para o vetor pValac (Figura 24B), amplificando com 737 pb. Neste contexto foi confirmada a construção de *L. lactis* MG1363 (pValac::IL-10) (Figura 24).



**Figura 24:** Confirmação da construção da linhagem de *L. lactis* MG1363 (pValac::IL-10). Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. **A)** Amplificação da ORF IL-10 com os iniciadores específicos para a ORF IL-10: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação; Canaleta 3: Controle positivo da reação; Canaleta 4: *L. lactis* MG1363 (pValac::IL-10) clone 1. **B)** Amplificação da ORF IL10 com os iniciadores específicos para o vetor pValac: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação; Canaleta 3: Controle positivo da reação; Canaleta 4: *L. lactis* MG1363 (pValac::IL-10).

Por outro lado, para confirmação dos possíveis clones obtidos na linhagem de *L. lactis* MG1363 FnBPA+, os plasmídeos extraídos também foram submetidos a uma reação de PCR, desta vez, utilizando os iniciadores específicos para a ORF IL-10, para o vetor pValac e os próprios do plasmídeo pOri23:FnbpA (Tabela 7), para detecção tanto da presença do plasmídeo pValac::IL-10 quanto do plasmídeo pOri23:FnbpA, já presente na linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA+. Desta forma foi confirmada a construção da linhagem invasiva contendo o plasmídeo de interesse, *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10) (Figura 25).

Pode ser observado que a presença do plasmídeo pValac::IL-10 foi confirmada, por PCR, na linhagem *L. lactis* MG1363 FnBPA+ utilizando os iniciadores específicos para a ORF IL-10 (Figura 25A), amplificando 537 pb, utilizando os iniciadores específicos para o vetor pValac (Figura 25B), amplificando 737 pb e, finalmente, utilizando os iniciadores específicos para a ORF FnBPA (Figure 25C), amplificando 807 pb.



**Figura 25:** Confirmação da construção da linhagem de *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10). Eletroforese em gel de agarose à 1% corado com brometo de etídio. **A)** Amplificação da ORF IL-10 com os iniciadores específicos para a ORF IL-10: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação; Canaleta 3: Controle positivo da reação; Canaleta 4: *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10). **B)** Amplificação da ORF IL-10 com os iniciadores específicos para o vetor pValac: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação; Canaleta 3: Controle positivo da reação; Canaleta 4: *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10). **C)** Amplificação da ORF FnBPA com os iniciadores específicos para a ORF FnBPA; Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Controle negativo da reação; Canaleta 3: *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10).

#### 5.4 Ensaio-piloto em camundongos com IBD experimental induzida por DSS

##### 5.4.1 Avaliação do efeito terapêutico do plasmídeo pValac::IL-10

A inflamação intestinal está associada com a regulação positiva de várias citocinas pro-inflamatórias. A IL-10 é conhecida por modular o ambiente imunológico para uma resposta imune Th2, controlando a inflamação por regulação negativa das cascatas inflamatórias e suprimindo a secreção destas citocinas pro-inflamatórias. Camundongos que não podem produzir espontaneamente IL-10 desenvolvem IBD (Kühn *et al.*, 1993), sugerindo o papel importante desta citocina anti-inflamatória na proteção contra a inflamação intestinal. O uso da IL-10 na prevenção de IBD tem sido demonstrado em vários experimentos, assim como também a eficiência em diversos ensaios clínicos, demonstrando ser uma boa candidata como terapia no tratamento de IBD (van Deventer *et al.*, 1997; Fedorak *et al.*, 2000; Steidler *et al.*, 2000; Colombel *et al.*, 2001; Braat *et al.*, 2006).

Em vista do mencionado, e a fim de avaliar o efeito terapêutico do plasmídeo pValac::IL-10, foi feito primeiramente um score macroscópico da colite, que avalia o peso corporal, antes, durante e ao finalizar o tratamento, o tamanho do cólon, a diarreia e o sangramento retal de cada animal (Tabelas de 09 a 14). Nos grupos animais com colite aguda induzida por DSS é esperado a ocorrência de perda de peso, diarreia e sangramento retal, encurtamento do cólon, destruição da camada epitelial e estrutura glandular do intestino (Okayasu *et al.*, 1990; Melgar *et al.*, 2005).

**Tabela 9:** Análises macroscópicas dos animais do Grupo 1 – FnBPA

Animal	G1 – FnBPA PESO (gramas)			Sacrifício <sup>d</sup>	Comp. Cólon (cm) <sup>e</sup>	Diarréia <sup>f</sup>	Sangram <sup>g</sup>
	Inicial <sup>a</sup>	Dia 7 DSS <sup>b</sup>	Dia 6 trat <sup>c</sup>				
1	18,83	18,65	19,09		10	s/ fezes (?)	-
2	18,77	18,65	18,44	18,55	9,5	leve	-
3	20,16	19,72	20,49	20,09	10,2	leve	-
4	18,29	18,56	18,35	18,24	8	+	leve
5	17,56	18,17	17,36	17,89	8,6	+	-
<b>Média</b>	18,722	18,75	18,746	18,6925	9,26		

<sup>a</sup>: Peso medido no primeiro dia do experimento antes do início do tratamento com DSS.

<sup>b</sup>: Peso medido no sétimo (7º) dia do tratamento com DSS.

<sup>c</sup>: Peso medido no sexto (6º) dia após o início do tratamento utilizando a linhagem *L. lactis* FnBPA.

<sup>d</sup>: Peso medido no dia do sacrifício dos animais.

<sup>e</sup>: Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em centímetros (cm) do ceco à porção terminal do cólon).

<sup>f</sup>: Observação da ausência ou da ocorrência de diarréia (leve, moderada, grave) nos animais.

<sup>g</sup>: Avaliação da presença ou ausência de sangramento nas fezes dos animais.

**Tabela 10:** Análises macroscópicas dos animais do Grupo 2 – FnBPA (pValac::IL-10)

Animal	G2 - FnBPA (pValac::IL-10) PESO (gramas)			Sacrifício <sup>d</sup>	Comp. Cólon (cm) <sup>e</sup>	Diarréia <sup>f</sup>	Sangram <sup>g</sup>
	Inicial <sup>a</sup>	Dia 7 DSS <sup>b</sup>	Dia 6 trat <sup>c</sup>				
1	16,71	16,25	16,95	17,68	9	-	-
2	18,01	18,1	17,89	18,51	8,6	-	-
3	19,25	18,43	19,21	19,75	8	-	-
4	19,76	18,3	19,45	19,6	9,2	leve	-
5	17,2	18,42	17,02	17,8	7,6	-	-
<b>Média</b>	18,186	17,9	18,104	18,668	8,48		

<sup>a</sup>: Peso medido no primeiro dia do experimento antes do início do tratamento com DSS.

<sup>b</sup>: Peso medido no sétimo (7º) dia do tratamento com DSS.

<sup>c</sup>: Peso medido no sexto (6º) dia após o início do tratamento utilizando a linhagem *L. lactis* FnBPA (pValac::IL-10).

<sup>d</sup>: Peso medido no dia do sacrifício dos animais.

<sup>e</sup>: Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em centímetros (cm) do ceco à porção terminal do cólon).

<sup>f</sup>: Observação da ausência ou da ocorrência de diarréia (leve, moderada, grave) nos animais.

<sup>g</sup>: Avaliação da presença ou ausência de sangramento nas fezes dos animais.

**Tabela 11:** Análises macroscópicas dos animais do Grupo 3 – MG1363

Animal	G3 - MG1363 PESO (gramas)			Sacrifício <sup>d</sup>	Comp. Cólon (cm) <sup>e</sup>	Diarréia <sup>f</sup>	Sangram <sup>g</sup>
	Início <sup>a</sup>	Dia 7 DSS <sup>b</sup>	Dia 6 trat <sup>c</sup>				
1	19,38	18,85	19,4	19,31	9,1	-	-
2	17,57	17,38	18,33	17,89	8	-	-
3	19,35	18,77	19,49	19,55	7,9	leve	-
4	17,43	17,35	17,67	17,64	8,6	-	-
5	17,9	17,56	18,9	18,7	8	leve	-
<b>Média</b>	18,326	17,982	18,758	18,618	8,32		

- <sup>a</sup>: Peso medido no primeiro dia do experimento antes do início do tratamento com DSS.  
<sup>b</sup>: Peso medido no sétimo (7<sup>o</sup>) dia do tratamento com DSS.  
<sup>c</sup>: Peso medido no sexto (6<sup>o</sup>) dia após o início do tratamento utilizando a linhagem *L. lactis* MG1363.  
<sup>d</sup>: Peso medido no dia do sacrifício dos animais.  
<sup>e</sup>: Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em centímetros (cm) do ceco à porção terminal do cólon).  
<sup>f</sup>: Observação da ausência ou da ocorrência de diarreia (leve, moderada, grave) nos animais.  
<sup>g</sup>: Avaliação da presença ou ausência de sangramento nas fezes dos animais.

**Tabela 12:** Análises macroscópicas dos animais do Grupo 4– MG1363 (pValac::IL-10)

Animal	G4 - MG1363 (pValac::IL-10) PESO (gramas)				Comp. Cólon (cm) <sup>e</sup>	Diarreia <sup>f</sup>	Sangram <sup>g</sup>
	Início <sup>a</sup>	Dia 7 DSS <sup>b</sup>	Dia 6 trat <sup>c</sup>	Sacrifício <sup>d</sup>			
1	18	19,08	19,46	19,18	9,8	-	-
2	17,36	18,18	18,59	17,8	8	-	oculto
3	19,8	17,78	20,13	20,24	9	-	-
4	19,55	19,67	19,91	19,78	9,1	-	-
5	18,31	18,25	18,73	18,42	9	-	-
<b>Média</b>	18,604	18,592	19,364	19,084	8,98		

- <sup>a</sup>: Peso medido no primeiro dia do experimento antes do início do tratamento com DSS.  
<sup>b</sup>: Peso medido no sétimo dia do tratamento com DSS.  
<sup>c</sup>: Peso medido no sexto dia após o início do tratamento utilizando a linhagem *L. lactis* MG1363 (pValac::IL-10).  
<sup>d</sup>: Peso medido no dia do sacrifício dos animais.  
<sup>e</sup>: Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em centímetros (cm) do ceco à porção terminal do cólon).  
<sup>f</sup>: Observação da ausência ou da ocorrência de diarreia (leve, moderada, grave) nos animais.  
<sup>g</sup>: Avaliação da presença ou ausência de sangramento nas fezes dos animais.

**Tabela 13:** Análises macroscópicas dos animais do Grupo 5 – DSS + Meio

Animal	G5 - DSS + Meio PESO (gramas)				Comp. Cólon (cm) <sup>e</sup>	Diarreia <sup>f</sup>	Sangram <sup>g</sup>
	Início <sup>a</sup>	Dia 7 DSS <sup>b</sup>	Dia 6 trat <sup>c</sup>	Sacrifício <sup>d</sup>			
1	18,81	18,22	19,43	18,84	10	-	-
2	19,19	20	21	20,24	8,8	moderada	-
3	20,7	20,64	22,28	21,04	8,2	-	-
4	17,5	17,35	18,48	17,6	8	-	-
5	18,21	18,98	20,01	18,9	8	-	-
<b>Média</b>	18,882	19,038	20,24	19,324	8,6		

- <sup>a</sup>: Peso medido no primeiro dia do experimento antes do início do tratamento com DSS.  
<sup>b</sup>: Peso medido no sétimo (7<sup>o</sup>) dia do tratamento com DSS.  
<sup>c</sup>: Peso medido no sexto (6<sup>o</sup>) dia após o início do tratamento utilizando apenas o meio M17.  
<sup>d</sup>: Peso medido no dia do sacrifício dos animais.  
<sup>e</sup>: Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em centímetros (cm) do ceco à porção terminal do cólon).  
<sup>f</sup>: Observação da ausência ou da ocorrência de diarreia (leve, moderada, grave) nos animais.  
<sup>g</sup>: Avaliação da presença ou ausência de sangramento nas fezes dos animais.

**Tabela 14:** Análises macroscópicas dos animais do Grupo6 – Controle

Animal	G6 – Controle PESO (gramas)			Sacrifício <sup>d</sup>	Comp. Cólon (cm) <sup>e</sup>	Diarréia	Sangram <sup>g</sup>
	Início <sup>a</sup>	Dia 7 DSS <sup>b</sup>	Dia 6 trat <sup>c</sup>				
1	16,65	17,74	18,21	18,6	9,5	-	-
2	17,74	17,71	17,78	17,77	8,6	-	-
3	19,9	20,02	21,17	20,44	10,8	-	-
4	19,16	19,4	20,22	19,89	9,2	-	-
5	16,41	17,23	17,34	18,8	9,2	-	-
6	16	16,65	17,57	16,67	8,7	-	-
<b>Média</b>	16,65	18,125	18,715	18,695	9,33333333		

<sup>a</sup>: Peso medido no primeiro dia do experimento antes do início do tratamento com DSS.

<sup>b</sup>: Peso medido no sétimo (7<sup>o</sup>) dia do experimento.

<sup>c</sup>: Peso medido no décimo terceiro (13<sup>o</sup>) dia do experimento.

<sup>d</sup>: Peso medido no dia do sacrifício dos animais.

<sup>e</sup>: Comprimento do cólon aferido com uma régua (medido em centímetros (cm) do ceco à porção terminal do cólon).

<sup>f</sup>: Observação da ausência ou da ocorrência de diarréia (leve, moderada, grave) nos animais.

<sup>g</sup>: Avaliação da presença ou ausência de sangramento nas fezes dos animais.

Posteriormente, após o sacrifício dos animais foram retirados o baço, o intestino delgado, o sangue e coletadas amostras de fezes. As regiões descendente dos cólons foram reservadas para futura avaliação da inflamação e das características histológicas (score microscópico), visando comparar os animais que não receberam o tratamento com aqueles que receberam as linhagens de *L. lactis* recombinantes portadoras do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10, esperando observar uma melhora na colite nestes últimos grupos.

Para finalizar, a região remanescente do cólon de cada animal, assim como o baço e o intestino delgado, serão utilizados para avaliar a resposta imune induzida, tanto local como sistêmica, após a administração das diferentes linhagens de *L. lactis* recombinantes. Assim, serão medidos, por ELISA, tanto os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, esperando observar um aumento desta, quanto das citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$ , esperando ver uma redução dos níveis das mesmas. A produção de IgA secretória (sIGA) nas fezes também será avaliado por ELISA, esperando observar um aumento dos mesmos nos animais que foram submetidos ao tratamento.

Enfim, este trabalho é pioneiro na utilização sítio-dirigida de linhagens invasivas de *Lactococcus lactis* carreando um plasmídeo terapêutico codificando a Interleucina 10 (IL-10), como nova ferramenta biológica para imunomodulação da inflamação intestinal. No entanto, os dados obtidos a partir deste primeiro ensaio piloto ainda precisam ser avaliados e analisados a fim de se confirmar a capacidade terapêutica do plasmídeo pValac::IL-10. Além disso, os resultados gerados a partir desse primeiro ensaio irão permitir um melhor delineamento dos próximos ensaios em animais e mais estudos ainda são necessários para explorar com clareza os fatores envolvidos nessa imunomodulação.

## **6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 6.1 Conclusões

Os resultados, até então obtidos e aqui apresentados, permitem concluir que:

- A construção e confirmação do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10 foi realizada com sucesso; a sequência codificadora da IL-10 de *M. musculus* foi isolada e clonada no vetor pValac e a construção final, pValac::IL-10, foi confirmada por PCR.
- A funcionalidade do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10 foi avaliada e confirmada através das técnicas de Imunocitoquímica e FACS; as células mamíferas da linhagem CHO transfectadas com o plasmídeo pValac::IL-10 foram capazes de produzir e expressar a proteína recombinante IL-10.
- Duas linhagens recombinantes de *L. lactis*, *L. lactis* MG1363 (pValac::IL-10) e *L. lactis* MG1363 FnBPA+ (pValac::IL-10), portadoras do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10 foram construídas e confirmadas. Estas linhagens foram utilizadas em um ensaio-piloto *in vivo* para avaliar a capacidade de entrega do plasmídeo pValac::IL-10 às células mamíferas e a capacidade terapêutica do plasmídeo no tratamento e prevenção das IBDs em modelos animais experimentais.

### 6.2 Perspectivas

Muito dos progressos recentes na compreensão da imunidade de mucosas e das IBDs foi alcançado através de estudos utilizando modelos animais experimentais de inflamação intestinal. Diversos estudos já demonstraram a eficácia da administração oral de linhagens de *L. lactis* expressando IL-10 em modelos animais de doenças alérgicas e inflamatórias (Steidler *et al.*, 2000; Marinho *et al.*, 2010). O presente trabalho apresenta uma nova estratégia utilizando linhagens invasivas de *L. lactis* como carreadoras de um plasmídeo terapêutico para expressão eucariótica sítio-dirigida da IL-10. Assim, a obtenção das diferentes linhagens de *L. lactis* portadoras do plasmídeo terapêutico pValac::IL-10 abrem amplas e diversas perspectivas para a continuidade deste projeto e outros estudos utilizando modelos animais experimentais de doenças alérgicas e inflamatórias devem ser realizados para confirmação, *in vivo*, do efeito terapêutico e imunomodulador dessa nova estratégia.

## 6.2.1 Ensaio-piloto em camundongos com IBD experimental induzida por DSS

Primeiramente os dados obtidos a partir do ensaio-piloto, já realizado, serão processados e analisados a fim de se confirmar a capacidade de entrega do plasmídeo pValac::IL-10 às células mamíferas, pelas linhagens de *L. lactis*, e a capacidade terapêutica do plasmídeo no tratamento e prevenção da colite induzida por DSS, em modelos murino.

Para avaliar os efeitos imunológicos da administração oral das linhagens recombinantes de *L. lactis* na colite ulcerativa experimental, os seguintes parâmetros serão determinados:

- Análise macroscópica e microscópica (histológica) do cólon.
- Determinação por ELISA da concentração de sIgA nas fezes
- Perfil de citocinas no extrato de cólon, baço e intestino delgado através dos experimentos de ELISA

A porção descendente do cólon que foi processada e submetida à análise histológica serão ranqueados às cegas, baseado no sistema de índice previamente descrito (McCafferty *et al.*, 2000) que classifica as seguintes características: extensão da destruição da arquitetura da mucosa, presença e grau de infiltração celular, extensão do espessamento do músculo, presença ou ausência de abscessos das criptas e a presença ou ausência de depleção das células caliciformes conforme tabela a seguir.

**Tabela 15:** Índice microscópico da doença inflamatória intestinal em camundongos

<b>Parâmetro</b>	<b>Classificação</b>
Extensão da destruição da arquitetura da mucosa	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 dano extensivo
Presença e grau de infiltração celular	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 infiltração transmural
Extensão do espessamento do músculo	0 normal, 1 leve, 2 moderada e 3 espessamento extensivo
Presença ou ausência de abscessos das criptas	0 ausente e 1 presente
Presença ou ausência de depleção das células caliciformes	0 ausente e 1 presente

As medidas realizadas serão comparadas, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey para calcular a significância entre os grupos, ambos disponíveis no software GraphPad Prism 5.0. O Teste t de Student também será utilizado para comparações entre dois grupos experimentais.

Posteriormente, novos ensaios *in vivo* também poderão ser realizados para avaliar a capacidade terapêutica do plasmídeo pValac::IL-10 no tratamento e prevenção de várias doenças inflamatórias e alérgicas em diferentes modelos animais experimentais.



## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas A.K; Lichtman A.H; Pillai, S. (2008) *Imunologia celular e molecular*; 6a edição; Elsevier editora Ltda.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.*, 4(7):499–511.
- Artis, D. (2008) Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol.*, 8(6):411–20.
- Bäckhed, F.; Ley, R.E.; Sonnenburg, J.L.; Peterson, D.A.; Gordon, J.I. (2005) Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, 307:1915–1920.
- Bahey-El-Din, M.; Gahan, C.G. (2010) *Lactococcus lactis*: from the dairy industry to antigen and therapeutic protein delivery. *Discov Med.*, 9(48):455–61.
- Bermúdez-Humarán, L.G.; Langella, P.; Cortez-Perez, N.; Gruss, A.; Tamez-Guerra, R.S.; Oliveira, S.C.; Saucedo-Cardenas, O.; Montes de Oca-Luna, R.; Le Loir, Y. (2003a) Intranasal administration of recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine Interleukine-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production, *Infect. Immun.*, 71:1887–1896.
- Bermúdez-Humarán, L.G.; Langella, P.; L'Haridon, R.; Gilbert, S.; Commissaire, J.; Le Loir, Y.; Corthier, G. (2003b) Controlled intra- and extracellular production of staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in *Lactococcus lactis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 229:37–42.
- Bermúdez-Humarán, L.G.; Corthier, G.; Langella, P.R. (2004) Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res. Devel. Microbiology*. 8:147–160.
- Bermúdez-Humarán, L. G.; Kharrat, P.; Chatel, J. M. ; Langella, P. (2011) Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*, 10(Suppl 1):S4
- Bernasconi E, Germond J-E, Delley M, Fritsché R, Corthésy B. (2002) *Lactobacillus bulgaricus* proteinase expressed in *Lactococcus lactis* is a powerful carrier for cell wall-associated and secreted bovine  $\beta$ -lactoglobulin fusion proteins; *Applied and Environmental Microbiology* 68:6; 2917-2923
- Bienenstock, J. and Befus, A. D. (1980) Mucosal immunology. *Immunology*, 41(2):249–70.
- Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauger, S.; Jaillon, O.; Malarme, K.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.*, 11:731–753.
- Bouma, G. and Strober, W. (2003) The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.*, 3(7):521–33.
- Braat, H.; Rottiers, P.; Hommes, D.W. (2006) A phase I Trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(6):754–759.
- Brandtzaeg, P. (1998) Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev.*, 56(1,2):S5–18.

- Bron, P.A.; van Baarlen, P.; Kleerebezem M. (2011) Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat Rev Microbiol.* 10 (1):66-78.
- Carr, F.J.; Chill, D.; Maida, N. (2002) The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4):281–370.
- Chatel, J.M.; Langella, P.; Adel-Patient, K.; Commissaire, J.; Wal, J.M.; Corthier, G. (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(3):545–51.
- Chatel, J.M.; Pothelune, L.; Ah-Leung, S.; Corthier, G.; Wal, J.M.; Langella, P. (2008) In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Therapy*, 1–7.
- Cho, J.H. (2008) Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol.*, 14(3):338–47.
- Colombel, F.F.; Rutgeerts, P.; Malchow, H.; Jacyna, M.; Nielsen, O.H.; Rask-Madsen, J.; Van Deventer, S.; Ferguson, A.; Desreumaux, P.; Forbes, A.; Geboes, K.; Melani, L.; Cohard, M. (2001) Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gut*, 49:42–46.
- Courvalin, P.; Goussard, S.; Grillot-Courvalin, C. (1995) Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C.R. Acad. Sci. III* 318, 1207–1212.
- Daudel, D.; Weidinger, G.; Spreng, S. (2007) Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 6:97–110.
- Dunham, S.P. (2002) The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci.*,73:9–16.
- Duwat, P.; Cesselin, B.; Sourice, S.; Gruss, A. (2000) *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *Int. J. Food Microbiol.*; 55:83-86.
- Elson, C.O.; Cong, Y.; Igbal, N.; Weaver, C.T. (2001) Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Semin Immunol.*, 13(3):187–94.
- Fedorak, R.N.; Gangl, A.; Elson, C.O. (2000) Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology*, 119:1473–1482.
- Fiorentino, D.F.; Bond, M.W.; Mosmann, T.R. (1989) Two types of mouse T helper cell. iV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, 170:2081–2095.
- Gewirtz, A.T. and Madara, J.L. (2001) Periscope, up ! Monitoring microbes in the intestine. *Nature Immunology*, 2(4):288–290.
- Glenting, J. and Wessels S. (2005) Ensuring safety of DNA vaccines. *Microb Cell Fact* 4 26.
- Grillot-Courvalin, C.; Goussard, S.; Courvalin, P. (1999) Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol.*, 10:477–481.

Guimarães, V.D.; Gabriel, J.E.; Lefèvre, F.; Cabanes, D.; Gruss, A.; Cossart, P.; Azevedo, V.; Langella, P., (2005) Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes and Infection*, 7:836–844.

Guimarães, V.D.; Innocentin, S.; Lefèvre, F.; Azevedo, V.; Wal, J.M.; Langella, P.; Chatel, J.M. (2006) Use of Native Lactococci as Vehicles for Delivery of DNA into Mammalian Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:91–7097.

Guimarães, V.; Innocentin, S.; Chatel, J.M.; Lefevre; Langella; Azevedo, V.; Miyoshi, A. (2009) A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic Vaccines and Therapy*, 7(4):1–24.

Hill, D.A. and Artis, D.(2010)Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol*. 28: p. 623-67.

Hoebe, K.; Janssen, E.; Beutler, B. (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.*, 5(10):971–4.

Hooper, L. V. and Macpherson, A. J. (2010) Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10:159–169.

Howard, M.; O’Garra, A. (1992) Biological properties of interleukin 10. *Immunology Today*, 13(6):198–200.

Innocentin, S., Guimarães, V., Miyoshi, A., Azevedo, V., Langella, P., Chatel., J.M., Lefèvre, F. (2009) *Lactococcus lactis* Expressing either *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A or *Listeria monocytogenes* Internalin A Can Efficiently Internalize and Deliver DNA in Human Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14):4870–4878.

Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.*, 5(10):987–95.

Izcue, A.; Coombes, J.L.; Powrie, F. (2009) Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol.*, 27:313–38.

Kamanaka, M.; Kim, S.T.; Wanetal, Y.Y. (2006) Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity*, 25(6):941–952.

Kawada, M.; Arihiro, A.; Mizoguchi, E. ( 2007) Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, v.13, n.42, Nov 14, p.5581-93.

Kitajima, S., Morimoto, M.; Sagara, E.; Shimizu, C.; Ikeda, Y. (2001) Dextran sodium sulfate-induced colitis in germ-free IqI/Jic mice. *Exp Anim.*, 50(5):387–95.

König, H.; Fröhlich, J. (2009). Lactic acid bacteria. In: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Musts and in Wine*. (Eds.) H. König; G. Uden; J. Fröhlich, XVIII, 522 p.; pp. 3-29 Springer, Heidelberg.

Kühn, R.; Lohler, J.; Rennick, D.; Rajewsky, K.; Muller, W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2):263–274.

- Kutzler, M. and Weiner, D.B. (2008) DNA vaccines: ready for prime time?. *Nature*, 9:776–788.
- Lakatos, L. e Lakatos, P.L. (2007) Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Orv Hetil.*, 148(5):223–8.
- Lalani, I.; Bhol, K.; Ahmed, A.R. (1997) Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 79(6):469–484.
- Ley, R. E.; Peterson, D.A. and Gordon, J. I. (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 124(4): p. 837-48.
- Magalhaes, J.G.; Tattoli, I. and Girardin, S.E. (2007) The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol*. 19(2): p. 106-15.
- Maguin E., Prévost H., Ehrlich S.D., Gruss A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol*. 178(3):931-5.
- Maloy, K.J. and Powrie, F. (2000) Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*. 474(7351): p. 298-306.
- Marinho, F. A. V.; Pacifico, L. G. G.; Miyoshi, A.; Azevedom V.; Le Loir, Y.; Guimarães, V.D.; Langella, P.; Cassali, G.D.; Fonseca, C.T.; Oliveira, S.C. (2010) An intranasal administration of *Lactococcus lactis* strains expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model. *Clinical and Experimental Allergy*, 40(10):1541–1551.
- Mccafferty, D. M.; Sihota, E.; Muscara, M.; Wallace, J.L.; Sharkey, K.A.; Kubes, P. (2000) Spontaneously developing chronic colitis in IL-10/iNOS double-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.279, n.1, Jul, p.G90-9.
- Melgar, S.; Karlsson, A.; Michaëlsson, E. (2005) Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.288, n.6, Jun, p.G1328-38.
- Melgar, S., Bjursell, M.; Gerdin, A.K.; Svensson, L.; Michaëlson, E.; Bohlooly-Y, M. (2007) Mice with experimental colitis show an altered metabolism with decreased metabolic rate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,. 292(1):G165-72.
- Mercenier, A.; Muller-Alouf, H.; Granette, C. (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol*. 2(1): 17-25.
- Mills, S.; McAuliffe, O.E.; Coffey, A.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P. (2006) Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol Rev* 30(2):243-73.
- Mocellin, S.; Marincola, F.; Rossi, C.R.; Nitti, D.; Lise, M. (2004) The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(1):61–76.
- Moore, K.W.; de Waal Malefyt, R.; Coffman, R.L.; and O’Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19:683–765.

- Mowat, A.M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.*, 3(4):331–41.
- Neish, A.S. (2009) Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1):65–80.
- Nell S., Suerbaum S., Josenhans C., (2010) The impact of the microbiota on the pathogenesis of IBD: lessons from mouse infection models. *Nature Reviews Microbiology*, 8:564–577.
- Ni, J., Chen, S.F.; Hollander, D. (1996) Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut*, 39(2):234–41.
- Norton, P.M.; Le Page, R.W.; Wells, J.M. (1995) Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol.*, 40(3):225–30.
- Nouaille S.; Ribeiro, L.A.; Miyoshi, A.; Pontes, D.; Le Loir, Y.; Oliveira, S.C.; Langella, P.; Azevedo, V. (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.*, 31;2(1):102–11.
- Opal, S.M.; Wherry, J.C.; Grint, P. (1998) Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 27(6):1497–1507.
- Okayasu, I.; Hatakeyama, S.; Yamada, M.; Ohkusa, T.; Inagaki, Y.; Nakaya, R. (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*, v.98, n.3, Mar, p.694-702. 1990.
- Perdigón, G.; Fuller, R.; Raya, R. (2001) Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 2(1):27–42.
- Pontes D.S., de Azevedo M.S., Chatel J.M., Langella P., Azevedo V., Miyoshi A. (2011) *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr Purif.*, 79(2):165–75.
- Poquet, I.; Ehrlich, S.D.; Gruss, A. (1998) An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 180:1904-1912.
- Poritz, L. S., Garver, K.I.; Green, C.; Fitzpatrick, L.; Ruggiero, F.; Koltun, W.A. (2007) Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res.*, 140(1):12–9.
- Que, Y.A.; Francois, P.; Haefliger, J.A.; Entenza, J.M.; Vaudaux, P.; Moreillon, P. (2001) Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun.*, 69:6296–302.
- Rakoff-Nahoum, S.; Paglino, J.; Eslami-Varzaneh, F.; Edberg, S.; Medzhitov, R. (2004) Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis *Cell*, 118:229–241.
- Ravn, P.; Arnau, J.; Madsen, S.M.; Vrang, A.; Israelsen, H. (2000) The development of TnNuc and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis*. *Gene*, 242:347-356.

- Rescigno, M.; Urbano, M.; Valzasina, B.; Francolini, M.; Rotta, G.; Bonasio, R.; Granucci, F.; Kraehenbuhl, J.P.; Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.*, 2(4):361–7.
- Robinson, K.; Chamberlain, L.M.; Schofield, K.M.; Wells, J.M.; Le Page, R.W. (1997) Oral Vaccination Of Mice Against Tetanus Using Recombinant *Lactococcus Lactis*. *Nature Biotechnology*, 15:653–657.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5463-5467.
- Sansonetti, P.J. (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol.*, 4(12):953–64.
- Sartor, R.B. (2006) Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 3:390–407.
- Sartor, R.B. (2008) Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134:577–594.
- Schaffner, W. (1980) Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2163–2167.
- Schoen, C.; Stritzker, J.; Goebel, W.; Pilgrim S. (2004) Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol.*, 294:319–335.
- Schotte, L.; Steidler, L.; Vandekerckhove, J.; Remaut, E. (2000) Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10):761–765.
- Schreiber, S.; Heinig, T.; Thiele, H. G.; Raedler, A. (1995) Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, May;108(5):1434-44.
- Schreiber, S.; Fedorak, R.N.; Nielsen, O.H. (2000) Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn’s disease. Crohn’s Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology*, 119:1461–1472.
- Sinha, B.; Francois, P.; Que, Y.A.; Hussain, M.; Heilmann, C.; Moreillon, P.; Lew, D.; Krause, K.H.; Peters, G.; Herrmann, M. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun.*, 68:6871–8.
- Sizemore, D.R.; Branstrom, A.A.; Sadoff, J.C. (1995) Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270, 299–302.
- Stahl, S.; Samuelson, P., Hansson, M., Andréoni, C., Goetsch, L., Libon, C., Liljeqvist, S., Gunneriusson, E., Binz, H., Nguyen, T.N. and Uhlén, M. , Development of non-pathogenic staphylococci as vaccine delivery vehicles. In *Recombinant Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal* in: J.M.a.P. Wells, G. (Ed.) *Development of non-pathogenic staphylococci as vaccine delivery vehicles. In Recombinant Gram-positive bacteria as*

vaccine vehicles for mucosal R. G. Landes Biomedical Publishers, New York, 1997, pp. . 61-81.

Steidler, L.; Robinson, K.; Chamberlain, L.; Schofield, K.M., Remaut, E.; Le Page, R.W.; Wells, J.M. (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun.*, 66:3183–3189.

Steidler, L.; Hans, W.; Schotte, L. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 289(5483):1352–1355.

Steidler, L.; Neiryck, S.; Huyghebaert, N.; et al. (2003) Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol.*, 21:785–789.

Steidler, L. and Vandenbroucker, K. (2006) Genetically modified *Lactococcus lactis*: novel tools for drug delivery. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2):140–146.

Strober, W., Fuss, I.; Mannon, P. (2007) The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.*, 117(3):514–21.

Suzuki, K. and Fagarasan, S. (2008) How host-bacterial interactions lead to IgA synthesis in the gut. *Trends Immunol.*, 29(11):523–31.

Tailliez, P. (2001) Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* 81:1-11.

Tao, L.; Pavlova, S. I.; Ji, X.; Jin, L.; Spear, G. (2011) A novel plasmid for delivering genes into mammalian cells with noninvasive food and commensal lactic acid bacteria. *Plasmid*, 65:8–14.

Tournoy, K. G.; Kips, J. C.; Pauwels, R. A. (2000) Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness. *Clinical and Experimental Allergy*, 30:775–783.

van de Guchte, M., Ehrlich, S.D., Maguin, E. (2001) Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. *J Appl Microbiol* 91:147-153.

Van Deventer, S.J.H.; Elson, C.O.; Fedorak, R. (1997) Multiple Doses of Intravenous Interleukin 10 in Steroid-Refractory Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 113:383–389.

Van Montfrans, C.; Van de Ende, A.; Fedorak, R.N.; Gangl, A.; Elson, C.O.; Rutgeerts, P.; Schreiber, S.; Wild, G.; Hanauer, S.; Grint, P.; Van Deventer, S.J.H. (1999) Anti-inflammatory effects of interleukin 10 in mild to moderate Crohn's disease (abstr). *Gastroenterology*, 116:A777.

Vassaux G, Nitcheu J, Jezzard S, Lemoine NR. (2006). Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol.* 208(2):290-8

Wells, J.M.; Wilson, P.W.; Norton, P.M.; Gasson, M.J.; Le Page, R.W. (1993b). *Lactococcus Lactis*: High-Level Expression Of Tetanus Toxin Fragment C And Protection Against Lethal Challenge. *Mol. Microbiol.*, 8:1155–1162.

Wells, J.M.; Mercenier, A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature*, 1038:1–14.



Williams, L.M.; Ricchetti, G.; Sarma, U.; Smallie, T.; Foxwell, B.M.J. (2004) Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation—a continuing puzzle. *Immunology*, 113(3):281–292.

Winkler, P., Ghadimi, D. Schrezenmeir, J.; Kraehenbuhl, J.P. (2007) Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr.*, 137(3 Suppl 2):756S–72S.

Wirtz, S.; Neufert, C.; Weigmann, B.; Neurath, M. F. (2007) Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols*, 2(3):541–546.