

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Clonagem, expressão e caracterização da interleucina 17 A de *Bos taurus*

Vitória Sequeira Gonçalves

Pelotas, 2015

VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES

Clonagem, expressão e caracterização da Interleucina 17 A de *Bos taurus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Ph.D Fábio Pereira Leivas Leite

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

G635c Gonçalves, Vitória Sequeira
 Clonagem, expressão e caracterização da interleucina 17A
 de *Bos taurus* / Vitória Sequeira Gonçalves. – 54f. : il. –
 Trabalho de conclusão de curso (Graduação em
 Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de
 Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientador
 Fábio Pereira Leivas Leite.

1.Biotecnologia. 2.Interleucina. 3.Expressão.
4.*Escherichia coli* I.Leite, Fábio Pereira Leivas. II.Título.

CDD: 616.926

Vitória Sequeira Gonçalves

Clonagem, expressão e caracterização da interleucina 17A de *Bos taurus*

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 01 de dezembro de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (orientador), Doutor em Ciências Veterinárias pela University of Wisconsin.

Prof. Dr. Rodrigo Casquero Cunha, Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Dr. Alceu Gonçalves dos Santos Junior, Mestre em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas.

Biotec. Renan Eugênio Araújo Piraine, Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

*“Dedico esse trabalho a estrela mais
brilhante do céu, meu avô Nercy Gomes
Sequeira”.*

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, por todas as graças recebidas e condições de ir atrás dos meus sonhos, sempre como forte sustento em minha vida.

Aos meus pais, Marta e João Arthur, pela dedicação, amor, atenção e doação. Agradeço por dividirem comigo cada anseio e alegria da minha caminhada, me incentivando, e sempre apoiando cada passo meu.

Ao meu irmão Arthur Gonçalves, por me acompanhar e torcer por mim, e fazer a distância não representar nada para nossa amizade.

As minhas avós, Zilda Sequeira e Ely Andrade, pelo aconchego e apoio durante toda a minha vida acadêmica.

A toda minha família, que sempre vibrou com as minhas vitórias e me impulsionou a conquistar mais.

Ao meu namorado, Vinicius Zorzi, pela compreensão nas horas difíceis, motivação e principalmente pelo companherismo de todas as horas, bem como a toda sua família pelo acolhimento, carinho e atenção.

Ao meu orientador acadêmico, Prof. Dr. Fábio Leite, pela oportunidade de estagiar, aprender e crescer durante a graduação, me disponibilizando o laboratório para pesquisa e transmitindo conhecimento fundamental para minha formação.

Ao meu orientador de estágio, Alceu Gonçalves, por toda paciência e disponibilidade para me ensinar e ajudar em todas as atividades realizadas no laboratório.

A toda equipe do Lab. 4, Rodrigo, Denis, Lívia, Iuri, Renan, Ilusca, Carolina, Jorge, Pedro, Yasmine e Tábata, e a equipe do Lab. 11, por toda ajuda e apoio, em especial nesse último semestre. E também a todos aqueles que já passaram por este grupo durante os anos da minha graduação. Obrigada pela convivência.

A todos os meus amigos, que de longe ou perto, torcem por mim e com certeza fizeram a diferença de alguma forma nesses quatro anos.

A estes, meu sincero muito obrigada

Resumo

GONÇALVES, Vitória Sequeira. **Clonagem, expressão e caracterização da interleucina 17 A de *Bos taurus***. 2015. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

As citocinas são mediadores celulares responsáveis pela comunicação celular. Agem em diferentes locais do organismo, podendo serem secretadas no local de estímulo ou migrarem para os locais necessários a partir de ativação de proteínases. Essas substâncias podem ser polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares e hidrossolúveis. Os linfócitos Th17 são células recentemente descritas, efectoras e importantes na proteção contra patógenos extracelulares, visto que estas secretam interleucina 17 entre outras citocinas. A IL-17A é classificada como pró-inflamatória e pertence a uma família de outras cinco IL-17 e é secretada com um peso molecular de aproximadamente 35 kDa. A produção recombinante dessa interleucina é um insumo importante para o estudo da modulação da resposta imune em infecções por patógenos. O sistema de expressão mais utilizado atualmente é em *Escherichia coli*, que possui o organismo geneticamente caracterizado, além de ter diversas vantagens no seu processo. O presente trabalho teve por objetivo a expressão do gene completo da interleucina 17A em *Escherichia coli*. A proteína recombinante produzida em *E. coli* Rosetta™, apresentou um tamanho de aproximadamente 35 kDa e foi purificada por cromatografia de afinidade e posteriormente concentrada. Para sua caracterização foram utilizados anticorpos monoclonais anti-histidina. Portanto, obtendo essa proteína de forma recombinante pode-se utilizar tal como alternativa para o estudo de mecanismos referentes ao bloqueio e estimulação da produção dela mesma.

Palavras-chave: Interleucina; expressão; *Escherichia coli*.

Abstract

GONÇALVES, Vitória Sequeira. **Cloning, expression and characterization of interleukin 17 A *Bos taurus***. 2015. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Cytokines are cellular mediators responsible for cellular communication. They act in different parts of the body and can be secreted in the stimulus site or migrate to the sites required from activation of protein kinases. These substances may be extracellular and soluble polypeptides or glycoproteins. The lymphocytes are newly described Th17 cells, effector cells that are important in protection against extracellular pathogens, since they secrete interleukin 17 and other cytokines. IL-17A is classified as pro inflammatory and belongs to a family of five other IL-17 and is secreted with a molecular weight of approximately 35kDa. The recombinant production of such interleukin is an important input to study the modulation of the immune response in infections by pathogens. The expression system is most widely used in *Escherichia coli*, which has the organism genetically characterized, and has several advantages in the process. This study aimed to express the complete gene of interleukin 17A in *Escherichia coli*. The recombinant protein produced in *E. coli* Rosetta™ was purified by affinity chromatography and then concentrated, presenting a size of approximately 35kDa. For characterization by Dot blot anti-histidine monoclonal antibodies were used. Therefore, getting this protein recombinant it might be may be use as alternative to study mechanisms such as which this cytokine stimulate cells as well by producing antibodies against It, studding r the blocking effect.

Keywords: Interleukin; expression; *Escherichia coli*

Lista de Figuras

Figura 1 – Gene da IL-17A.....	37
Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1% - Produto amplificado na reação de PCR das diferentes concentrações de cDNA e temperaturas de anelamento	38
Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1% - Extração plasmidial.....	39
Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1% - confirmação dos clones pAE/IL-17A	40
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1% - digestão do fragmento de IL-17A com a enzima de restrição <i>KpnI</i>	41
Figura 6 – SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% - expressão da rIL-17A.....	42
Figura 7 – SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% - confirmação da expressão da rIL-17A	43
Figura 8 – Purificação da rIL-17A.....	44
Figura 9 – SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% - resultado da concentração..	45
Figura 10 – Membrana de nitrocelulose – resultado <i>Dot Blot</i>	45

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequência dos oligo iniciadores utilizados para obter a sequência da IL-17A.....	33
---	----

Lista de Abreviaturas

BCR – receptor de antígenos dos linfócitos B	NF- κ B – fator nuclear κ B
CD4 – <i>Cluster of differentiation 4</i>	NK – <i>Natural Killer</i>
CD8 – <i>Cluster of differentiation 8</i>	PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos - <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
DCs – células dendríticas	pb – pares de base
G-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos	PBS- <i>phosphate buffered saline</i>
h – horas	RRP – Receptores de Reconhecimento Padrão
IC – Imunocomplexos	TCR – receptor de antígenos dos linfócitos T
IFN – interferon	Tfh – <i>T helper follicular</i>
IL – Interleucina	Th – <i>T helper</i>
kDa – kilodalton	TLRs – Receptores <i>Toll-like</i>
LB – Linfócitos B	TNF – fator de necrose tumoral
LT – Linfócitos T	TNFR – receptor de TNF
M – molar	TRAF-6- fator associado a TNFR
MAP – <i>Mitogen Activated Protein</i>	Treg – <i>T regulatory</i>
mg – miligrama	μ g – micrograma
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade - <i>Major Histocompatibility Complex</i>	μ L – microlitro
min – minutos	μ m – micrometro
mL – mililitro	
mM – minimolar	
NET - <i>Neutrophilic Extracellular Traps</i>	

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Revisão bibliográfica.....	15
2.1. Sistema Imune.....	15
2.2. Imunologia Inata.....	17
2.2.1. Células.....	19
2.2.1.1. Neutrófilos	19
2.2.1.2. Macrófagos	21
2.2.1.3. Mastócitos.....	21
2.2.1.4. Basófilos e Eosinófilos	22
2.2.1.5. Células Dendríticas	23
2.2.1.6. Células <i>Natural Killer</i> (NK).....	24
2.2.2. Sistema Complemento	24
2.2.3. Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs).....	25
2.2.4. Receptores <i>Toll-like</i> (TLR)	26
2.3. Imunologia Adquirida	27
2.3.1. Linfócitos	27
2.3.1.1. Linfócitos B.....	28
2.3.1.2. Linfócitos T	29
2.3.1.2.1. Linfócitos T Citotóxicas CD8	30
2.3.1.2.2. Linfócitos T auxiliares (Th) CD4	30
2.4. Citocinas.....	31
2.5. Interleucina 17	32
3. Objetivos	34
3.1. Objetivos gerais	34
3.2. Objetivos específicos	35
4. Metodologia.....	35
4.1. Desenho <i>in silico</i> dos iniciadores.....	35
4.2. Amplificação da sequência da IL-17 a partir de cDNA de esplenócitos bovinos	35
4.3. Clonagem no plasmídeo pAE do gene IL-17A	36
4.4. Seleção dos clones e confirmação da clonagem	37
4.5. Expressão da rIL-17A.....	37

	13
4.6. Purificação da rIL-17A	38
4.7. Caracterização da rIL-17.....	39
5. Resultados e discussão	40
5.1. Contrução dos iniciadores	40
5.2. A PCR.....	40
5.3. Clonagem e seleção dos clones	41
5.4. Caracterização.....	43
5.5. Expressão da rIL-17A.....	44
5.6. Purificação.....	46
5.7. <i>Dot Blot</i>	48
6. Conclusões e Perspectivas	50
7. Referências	51

1. Introdução

O sistema imune é o responsável pela defesa do organismo contra doenças. O organismo é composto por duas principais linhas de defesa. A primeira linha de defesa é representada como resposta imune inata, que compreende barreiras físicas, químicas e biológicas, independentes de um contato prévio com o agente infectante (MEDZHITOV et al., 2000). As principais células envolvidas nessa etapa são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK) (MURPHY, 2014). Quando a primeira linha de defesa não consegue controlar a infecção, a segunda linha a atuar é a imunidade adquirida, que tem como principais células os linfócitos. Essas células são divididas em três classes que distinguem em suas funções: os linfócitos NK, os linfócitos T e os linfócitos B (TIZARD, 2014).

Os linfócitos B são os responsáveis por produzirem anticorpos, fornecendo imunidade de memória (TIZARD, 2014), enquanto os linfócitos T se dividem em citotóxicos (CD8) e auxiliares (Th) CD4 (PARKIN et al., 2001). Dentro das linfócitos T CD4 auxiliares são diferenciadas principalmente 5 subpopulações, sendo Th1, Th2, Th17, Tfh e Treg (MURPHY, 2014), que são distinguidas de acordo com o padrão de mediadores celulares secretados por elas, e por consequência, por sua resposta efetora (BRADLEY et al., 2003).

A subpopulação Th17 de linfócitos T é destacada por atuarem como importantes células na proteção contra infecções por microrganismos extracelulares (WAITE et al., 2012). Os linfócitos Th17, além de secretarem principalmente a interleucina 17, secretam também IL-22 e IL-26 (CHEN et al., 2007).

As citocinas são os principais mediadores celulares, responsáveis pela comunicação celular, podendo ser polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares. São hidrossolúveis e podem variar de 8 a 30kDa. Elas atuam principalmente de forma parácrina e autócrina (LIN et al., 2000). Dependendo de sua ação sobre as células, elas podem ser consideradas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias, regulando dessa forma a atividade, diferenciação, proliferação e a sobrevivência da célula, além do controle da produção e da atividade de outras citocinas (CURFS et al., 1997). As citocinas foram agrupadas em interleucinas, fatores de necrose

tumoral, quimiocinas, interferons e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBURNS et al., 2002).

A IL-17A é uma citocina altamente pró-inflamatória, secretada com aproximadamente 35kDa, produto do gene que possui 150 aminoácidos, pertencente a uma família com mais 5 interleucinas 17 (MOSELEY, et.al., 2003). Quando encontra seu receptor a IL-17 ativa as vias de MAP quinases, e os fatores de transcrição NF- κ B, TNFR e TRAF-6, que vão regular a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias (SHALOM-BARAK et.al., 1998), favorecendo dessa forma o recrutamento de neutrófilos no sítio de infecção aguda (STARK, et.al., 2005). Além de estar sendo relatada como uma citocina ativa no desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamações e alguns tumores (TIZARD, 2014), sabe-se que seu principal papel biológico é a ativação de neutrófilos durante o processo inflamatório (STARK et.al., 2005) e a ação contra patógenos (AUJLA et.al., 2008).

2. Revisão bibliográfica

2.1. Sistema Imune

Imunologia compreende o estudo das defesas do organismo contra doenças. Atualmente são descritas amplas categorias de microrganismos que causam doenças: os vírus, as bactérias, os fungos patogênicos e outros organismos eucarióticos relativamente grandes e complexos coletivamente chamados de parasitas (MEDZHITOV et al., 2000).

Uma resposta imune específica, assim como a produção de anticorpos contra um patógeno ou seus produtos é conhecida como uma resposta imune adaptativa, porque é desenvolvida durante a vida de um indivíduo como uma adaptação a infecção por aquele patógeno específico (MURPHY, 2014). Em muitos casos uma resposta imune adaptativa resulta em um fenômeno conhecido como memória imunológica, o que confere imunidade protetiva, por toda a vida, contra reinfecções pelo mesmo patógeno. Já a resposta imune inata está sempre imediatamente disponível para combater uma grande gama de patógenos, mas não conduz uma

imunidade duradoura e não é específica para nenhum patógeno individual (DELVES et.al., 2000).

A primeira etapa que o sistema imune deve cumprir para proteger o indivíduo de maneira eficaz contra uma doença é o reconhecimento imunológico, que compreende pela detecção de uma infecção. Essa tarefa é realizada pelas células do sistema imune inato às quais vão proporcionar uma resposta imediata (BANCHEREAU et al., 2000). A segunda etapa corresponde a conter a infecção e, se possível, eliminá-la por completo, o que envolve a ação das funções imune efectoras, bem como o sistema do complemento de proteínas sanguíneas, anticorpos, e a capacidade destrutiva dos linfócitos e outras células sanguíneas brancas. O sistema imune é capaz de se autorregular para que não traga danos ao próprio organismo. A falha dessa regulação pode contribuir para o desenvolvimento de determinadas condições como alergias e doenças autoimunes. E por fim, a última etapa é proteger o indivíduo contra a recorrência de uma doença resultante da infecção por um mesmo patógeno (MESQUITA JUNIOR et al., 2010).

Ambas as respostas imunes, inata e adaptativa, dependem de atividades das células sanguíneas brancas ou de leucócitos. Todas essas células são originárias da medula óssea, e muitas delas também se desenvolvem e maturam nesse ambiente (MEDZHITOV et al., 2000). Portanto elas migram para vigiar dos tecidos periféricos, sendo que algumas delas permanecem dentro dos tecidos, outras circulando na corrente sanguínea e em um sistema especializados de vasos chamado sistema linfático, que tem a função de drenar fluídos extracelulares e células livres dos tecidos, transportando-as pelo corpo como linfa e, finalmente, as devolve ao sistema sanguíneo (MURPHY, 2014).

Os órgãos linfoides, ou tecidos linfóides podem ser organizados de maneira geral em centrais (medula óssea e timo), que corresponde o lugar onde os linfócitos são produzidos, e em órgãos periféricos (linfonodos, baço e tecidos linfoides da mucosa), onde os linfócitos virgens maduros são mantidos e as respostas imunes adaptativas são iniciadas. Os linfonodos são órgãos linfoides de extrema organização, localizados nos pontos de convergência de vasos do sistema linfático, que coleta líquido extracelular (linfa) dos tecidos e retorna-o ao sangue (LUCIANI et al., 2006). A linfa circula lentamente favorecendo todos os processos de fagocitose.

As moléculas processadas podem ser apresentadas na superfície por células dendríticas apresentadoras de antígeno (JUNQUEIRA et al., 2012).

2.2. Imunologia Inata

A imunidade inata é representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (MEDZHITOV et al., 2000).

A imunidade inata, como é considerada a primeira linha de defesa contra infecções, fornece proteção já na superfícies epiteliais do organismo. Os epitélios impõem uma barreira física entre o meio interno e o externo, que contém patógenos. Esses epitélios incluem a pele e os revestimentos das estruturas tubulares do corpo: trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário. Essas células epiteliais tem por característica estarem unidas por junções ocludentes, que formam um bloqueio efetivo contra o ambiente externo (PARKIN et al., 2001). As infecções vão ocorrer quando um patógeno coloniza ou consegue atravessar estas primeiras barreiras. A importância do epitélio na proteção contra a infecção torna-se evidente quando a barreira é rompida, como ferimentos, queimaduras e perda de integridade do epitélio. Quando não houver lesão nesta barreira os patógenos podem estabelecer uma infecção pela adesão específica e pela colonização das superfícies epiteliais (MEZHITOV et al., 2000).

A mucosa epitelial secreta um líquido denominado muco, constituído de glicoproteínas denominadas de mucinas, que são glicoproteínas. O muco possui várias funções protetoras. Os microrganismos recobertos pelo muco podem ser impedidos de aderir ao epitélio e, no trato respiratório, podem ser expelidos pelo fluxo de mucosa (HAMMAD et al., 2015). Além disso, o sistema imune inato ainda conta com pH ácido do estômago, as enzimas digestivas, os sais biliares, os ácidos graxos e os lisolipídeos presentes no trato gastrintestinal, que ajudam na defesa do organismo. Um grupo importante de proteínas com função antimicrobiana inclui as enzimas que atacam as características químicas específicas da parede celular

bacteriana. Entre elas estão a lisozima, que é uma glicosidase que quebra uma ponte química presente no componente peptidoglicano da parede celular bacteriana, e a fosfolipase A_2 secretora, ambas secretadas nas lágrimas, na saliva e pelos fagócitos. Um segundo grupo de agentes antimicrobianos secretados pelas células epiteliais e pelos fagócitos inclui os peptídeos antimicrobianos, que compreendem as defensinas (rompem a membrana celular de bactérias, fungos e a membrana do envelope de alguns vírus), as catelicidinas (pró-peptídeo inativo que quando secretado rompe a membrana e é tóxico para uma grande variedade de microrganismos) e as histadinas (ativos contra fungos patogênicos) (TIZARD, 2014).

As bactérias não patogênicas que recobrem grande parte da superfície epitelial são conhecidas como bactérias comensais ou microbiota e competem com os microrganismos patogênicos pelos nutrientes e pelo sítio de adesão nas células epiteliais. Algumas dessas bactérias ainda produzem substâncias antimicrobianas como o ácido láctico, e algumas linhagens também podem produzir bacterinas (peptídeos antibacterianos) (JACK et al., 1995). Sob algumas circunstâncias, os próprios microrganismos comensais podem causar doenças caso o seu crescimento seja incontrolável ou ainda se o sistema imune estiver comprometido (FRANK et al., 2002).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer*. Os seus mecanismos característicos são fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência ubíqua em microrganismos, mas que não ocorrem na espécie humana. Moléculas tais como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos, comumente encontradas na superfície de microrganismos, constituem os padrões moleculares associados a patógenos, ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento Padrão dentre os quais destacam-se a família dos receptores *Toll-like* (MEDZHITOV et al., 1997).

Entre os vários RRP's envolvidos em opsonização, ativação de complemento e fagocitose, os TLRs se destacam por seu papel central na ligação de patógeno e

iniciação da resposta inflamatória. Esses receptores estão presentes principalmente em macrófagos, neutrófilos, e células dendríticas (CRUVINEL et al., 2010).

A fagocitose tem início pela ligação dos receptores de superfície do fagócito ao patógeno, o qual, então é internalizado em vesículas denominadas fagossomos. No interior do fagócito o fagossomo funde-se a lisossomos, cujo conteúdo é liberado com a digestão e a eliminação do patógeno (ABBAS, 2013).

2.2.1. Células

2.2.1.1. Neutrófilos

Os neutrófilos são os leucócitos que aparecem em maior quantidade no sangue periférico, desempenhando um papel crucial nas fases precoces das reações inflamatórias e sensíveis a agentes quimiotáxicos. Estão entre as primeiras células a migrarem dos vasos para os tecidos atraídos por quimiocinas, como interleucina 8, e são ativados por estímulos, como produtos bacterianos, proteínas do complemento (C5a), imunocomplexos, quimiocinas e citocinas (AMULIC et al., 2012).

A ligação de seus receptores para opsoninas promove a estimulação da sua capacidade fagocitária. O processo de fagocitose pode-se dividir em etapas: ativação, quimiotaxia, adesão, ingestão e destruição. Quando os neutrófilos se ligam as células endoteliais e recebem um sinal duplo, composto pela ligação com a integrina e o estímulo TNF- α ou proteínas do complemento, secretam elastase, defensinas e oxidantes. Os neutrófilos são atraídos para as áreas de maiores concentrações de quimiotáticos (difundidos a partir dos sítios de invasão microbiana). As opsoninas recobrem as bactérias com a intenção de neutralizar a carga eletrostática, promovendo a adesão (KOLACZKOWSKA et al., 2013).

A superfície das células fagocíticas é também recoberta por muitos receptores de reconhecimentos padrão, que podem interagir com seus ligantes na superfície de agentes infecciosos. Quando um neutrófilo encontra uma bactéria, o lamelipódio flui por cima e ao redor do organismo, e há ligação entre as opsoninas presentes no microrganismo e os receptores da superfície do neutrófilo. A bactéria é por fim

atraída para a célula e engolfada, entrando em um vacúolo chamado fagossomo. Por meio de dois processos distintos ocorre a destruição do agente infeccioso, um envolve a geração de potentes oxidantes e outro a liberação de enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos do grânulos intracelulares (KOLACZKOWSKA et al., 2013).

Essas células também sofrem degranulação, ocasionando a liberação de três classes de grânulos para o meio extracelular, sendo eles:

- 1) Grânulos primários: contêm mediadores importantes;
- 2) Grânulos secundários: contêm componentes secretados exclusivamente por neutrófilos;
- 3) Grânulos terciários: contêm principalmente as proteínas catepsinas e gelatinases (BRINKMANN et al., 2004).

Estudos mostram que os neutrófilos também podem gerar as chamadas “armadilhas neutrofílicas” ou “*neutrophilic extracellular traps*”, que são capazes de anular fatores de virulência e destruir bactérias extracelulares. A NET é um tipo de morte celular, onde o material do núcleo da célula é liberado, formando uma rede de fibras extracelulares. Essa rede de DNA é revestida por proteínas antimicrobianas, sendo assim, muito importantes para contenção de invasores microbianos (ZAWROTNIAK et al., 2013).

A produção de neutrófilos é regulada por uma citocina denominada G-CSF, e a sua diminuição, por sua taxa de apoptose. Neutrófilos normais migram para os tecidos, onde por fim passam a ser apoptóticos e são fagocitados por macrófagos. A produção de G-CSF é regulada por sua taxa de apoptose. Assim, neutrófilos que estão morrendo são removidos por macrófagos. Estes macrófagos produzem interleucina 23 de modo que, conforme os neutrófilos morrem, a produção de IL-23 aumenta. A IL-23 promove a produção de IL-17 por linfócitos. A IL-17 estimula a produção de G-CSF e atividade das células-tronco. Assim, a taxa de produção de neutrófilos é compatível com sua taxa de remoção por apoptose (AMULIC et al., 2012).

2.2.1.2. Macrófagos

Os macrófagos são fagócitos eficientes, originados da maturação dos monócitos que circulam na corrente sanguínea. Quando as células imaturas migram para os tecidos, tornam-se macrófagos (TIZARD, 2014). Eles não apenas detectam e controlam microrganismos invasores como também, quando estimulados, secretam citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e o TNF- α) que promovem respostas imunes inatas e adaptativas. São capazes de controlar a inflamação contribuindo diretamente para o reparo de tecidos lesionados ao remover células mortas, e auxiliando o processo de cicatrização (MOSSER et al., 2008). Além disso, essas células reconhecem a lesão tissular, promovem o recrutamento de neutrófilos e regulam os processos pelos quais os neutrófilos recrutam monócitos (TIZARD, 2014).

Em caso de invasão microbiana e desenvolvimento de inflamação, os monócitos do sangue respondem e se ligam a células endoteliais vasculares de forma similar aos neutrófilos. Várias horas depois da entrada dos neutrófilos no sítio inflamatório, os macrófagos chegam. Os macrófagos liberam colagenases e elastases que destroem o tecido conjuntivo próximo (GORDON et al., 2005).

2.2.1.3. Mastócitos

Os mastócitos têm sido cada vez mais descritos como células efetoras do sistema imune inato, que se localizam em todo o corpo, mas especialmente nas interfaces com o meio externo e perto dos vasos sanguíneos, contribuindo na proteção contra patógenos, através do seu recrutamento para os sítios de infecção. (JÖNSSON et al., 2012).

Os mastócitos de rato também têm sido associados no combate a infecção por helmintos, durante qual eles proliferam e contribuem para a expulsão do organismo através de vários mecanismos. Da medula óssea, os progenitores migram para os tecidos periféricos como células imaturas e se diferenciam *in situ* de acordo com as características particulares do microambiente (KALESNIKOFF et al. 2008).

São ativados pelo reconhecimento de antígenos multivalentes pelas IgEs. Estímulos como produtos da ativação do complemento, substâncias básicas,

inclusive alguns venenos de animais, certos neuropeptídeos e diversos agentes físicos também podem ativar mastócitos, independentemente da ligação de IgE. A ligação de componentes bacterianos aos TLRs 1, 2, 4 e 6 e a outros receptores específicos, como o CD48, também ativa os mastócitos, levando à liberação de mediadores (CRUVINIEL et al., 2010).

Há evidências experimentais da participação de mastócitos também em doenças cardiovasculares, processos neoplásicos, infecções parasitárias e bacterianas, enfermidades fibrosantes e doenças autoimunes (KALESNIKOFF et al., 2008).

2.2.1.4. Basófilos e Eosinófilos

São granulócitos derivados de progenitores na medula óssea, e lá mesmo amadurecem. Constituem em torno de menos de 1% dos leucócitos circulantes no sangue periférico. Embora não estejam normalmente presentes nos tecidos, podem ser recrutados para sítios inflamatórios, em conjunto com eosinófilos. São ativados por complexos IgE-antígeno, podendo contribuir para as reações de hipersensibilidade imediata (CRUVINIEL et al., 2010).

Os granulócitos eosinófilos são células cruciais no combate a infecções, sendo sua ação antiparasitária (helmintos) uma das mais potentes e eficazes do organismo. São também importantes nas reações alérgicas e asma. Os eosinófilos se desenvolvem na medula óssea, produzindo e armazenando muitos grânulos proteolíticos secundários antes de sair da medula. Após a maturação, circulam pela corrente sanguínea em pequenas quantidades, podendo ser encontrados em maior número nas regiões de mucosas, como do trato gastrintestinal, respiratório e geniturinário (ABBAS, 2003). São recrutados por quimiocinas e moléculas de adesão para os sítios de infecção parasitária e reações alérgicas (PARKIN et al., 2001).

Uma vez ativados, os eosinófilos induzem inflamação, mediante produção e liberação do conteúdo dos grânulos catiônicos eosinofílicos. Os principais componentes desses grânulos são: proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica, neurotoxina derivada de eosinófilos e peroxidase eosinofílica, que têm

grande potencial citotóxico sobre parasitas, mas também podem causar lesão tecidual (HOGAN et al., 2008).

2.2.1.5. Células Dendríticas

As células dendríticas, especializadas na captura e apresentação de antígenos para os linfócitos, são consideradas uma ponte entre imunidade inata e adaptativa, por serem atraídas e ativadas por elementos da resposta inata e viabilizarem a sensibilização de linfócitos T auxiliares da resposta adaptativa. Essas células permanecem em tecidos periféricos, como pele, fígado, intestino, onde capturam antígenos e se tornam ativas, migrando para os linfonodos regionais, onde processam e apresentam antígenos protéicos ou lipídicos aos linfócitos T. As células dendríticas imaturas são altamente eficazes na captura de antígenos, enquanto as maduras são mais eficientes na apresentação de antígenos (BANCHEREAU et al., 2000). Os antígenos capturados são processados dentro das células e apresentados em sua superfície, inseridos em moléculas apresentadoras de antígenos (MHCs).

Durante sua vida útil, as DCs imaturas migram da medula óssea pela corrente sanguínea, atingindo tecidos periféricos como a pele, onde se tornam residentes. Um aspecto curioso é que as DCs são as primeiras células a chegarem a um sítio infeccioso, precedendo até mesmo os neutrófilos (BANCHEREAU et al., 2000). Após o contato com o antígeno, as DCs se tornam ativadas e migram pelos vasos linfáticos até os órgãos linfóides secundários. Podem receber sinais de maturação a partir de células NK, Linfócitos *Natural Killer T* e LT, de moléculas pro-inflamatórias, como citocinas, prostaglandinas e interferons e dos PAMPs (BANCHEREAU et al., 2000). As células dendríticas retêm o antígeno nos órgãos linfóides por períodos extensos, o que pode contribuir para a memória imunológica (CRUVINEL et al., 2010).

2.2.1.6. Células *Natural Killer* (NK)

Elas se desenvolvem na medula óssea das mesmas células progenitoras como linfócitos T e linfócitos B e circulam no sangue, constituindo de 5% a 20% das células monocleares do sangue (CERWENKA et al., 2001). Elas são classificadas como células do sistema imune inato devido a seus receptores invariáveis (MURPHY, 2014).

As células NK podem ser ativadas em resposta a IFNs ou citocinas derivadas dos macrófagos. Podem reconhecer e destruir células tumorais e células infectadas, acreditando-se que antes do início da resposta imune adaptativa elas sejam importantes para manter as infecções virais sob controle. Possuem grânulos citoplasmáticos que contêm proteínas citotóxicas distintas e são funcionalmente identificadas pela sua habilidade de destruir certas linhagens de células tumorais *in vitro* sem a necessidade de imunização específica (YOKOYAMA et al., 2004). Esses grânulos contêm granzimas citotóxicas e a proteína formadora de poros perforina, as quais são liberadas na superfície da célula-alvo. A célula liga-se através de seus receptores de superfície celular programada. Além disso, secretam citocinas pró-inflamatórias como, IL-1, IL-2 e principalmente IFN- γ (CERWENKA et al., 2001).

2.2.2. Sistema Complemento

O sistema complemento é um conjunto de proteínas solúveis presentes no sangue e em outros líquidos corporais. É composto por mais de 30 diferentes proteínas plasmáticas, que são produzidas principalmente no fígado. Quando não há manifestação de infecção no organismo, essas proteínas circulam na forma inativa; quando na presença do patógeno ou de anticorpos ligados a patógenos, o sistema complemento sofre ativação (SARMA et al., 2011). Apesar de seu papel principal ser a proteção contra infecções, o sistema complemento pode regular os processos inflamatórios, remover células danificadas ou alteradas, enviar sinais de “perigo” para o corpo e regular a resposta imune adaptativa (RICKLIN et al., 2010).

As proteínas do complemento são ativadas de forma gradual, conferindo a esses complexos processos composto de três principais etapas. A primeira etapa

compreende a sua ativação, que pode ser dado de três formas descritas: via clássica, via alternativa e via da lecitina. A segunda etapa é a produção de uma proteína chamada C3b. Já na terceira etapa o complexo terminal do complemento é montado através de uma via de amplificação (RICKLIN et.al., 2010). Diferentes proteínas do complemento interagem umas com as outras para formar várias vias de diferente ativação do sistema, sendo que todas terão o objetivo comum de destruir o patógeno (MURPHY, 2014).

As vias alternativas e das lecitinas são ativadas diretamente pelos carboidratos microbianos, diferindo da via clássica que é ativada por anticorpos ligados a superfície de um organismo e assim funciona somente em conjunto com a resposta imune adaptativa (SARMA et al., 2011).

A regulação da ativação do sistema complemento é promovida por proteínas solúveis circulantes juntamente com as acopladas à membrana celular. Esse mecanismo é espécie-específico, sua ativação do em baixos níveis não compromete as células do próprio organismo e impede que, nos momentos de intensa ativação, ocorra deposição dos complexos gerados sobre as células (ITURRY-YAMAMOTO et al., 2000).

2.2.3. Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs)

Os microrganismos crescem muito rápido, bem como são altamente diversificados e podem sofrer mutações que alteram muitas de suas moléculas de superfície com rapidez. Portanto, o sistema imune não tenta reconhecer todas as possíveis moléculas microbianas, mas sim utilizar receptores que podem se ligar e responder a moléculas essenciais e abundantes comuns a diversos microrganismos, mas ausentes dos tecidos animais normais. Tais moléculas são padrões moleculares amplamente distribuídos (WILLART et al., 2013).

Os receptores que reconhecem os PAMPs são em geral reconhecidos como receptores de reconhecimento de padrões, e são aptos a reconhecer estruturas como oligossacarídeos, ricos em manose, peptídeoglicanos e lipossacarídeos da

parede celular bacteriana e DNA CpG não metilado, comuns a muitos patógenos e conservados durante evolução (MURPHY, 2014).

2.2.4. Receptores *Toll-like* (TLR)

Os receptores do tipo *Toll* são proteínas transmembrana com a característica de serem altamente conservadas. Responsáveis pela detecção e reconhecimento de patógenos microbianos extracelulares, como fungos e bactérias, assim como a geração de sinais para a produção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias. Outros TLRs estão presentes no interior das células, sendo responsáveis pela detecção de invasores intracelulares, como os vírus (KAWAI et al., 2010).

Os TLRs funcionam como PRR presentes nas células do sistema imune inato, responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs, que são expressos por uma grande gama de agentes infecciosos (IWASAKI et al., 2010). Sendo assim, a ativação da imunidade inata a partir da associação PRR-PAMP é um passo crucial no desenvolvimento da imunidade adquirida contra os antígenos específicos (ARANCIBIA et al., 2007). De acordo com o número de possíveis combinações de cadeias de TLRs, acredita-se que os TLRs atualmente conhecidos, possam, coletivamente, reconhecer quase todos os PAMPs (TIZARD, 2014).

É necessário que ocorra um equilíbrio entre a ativação e inativação dos TLRs, para assim evitar que ocorra uma resposta inflamatória ou imunológica excessiva. A ativação desses receptores pode ser regulada por diferentes moléculas que permitem um equilíbrio, a partir dos receptores reguladores intra e extracelular (ARANCIBIA et al., 2007).

No momento em que um PAMP encontra e liga-se ao seu TLR correspondente, a célula recebe sinais, que desencadeiam a formação de complexos multiproteicos de sinalização e portanto, o desencadeamento de cascatas de transdução de sinal, e por fim a célula pode produzir moléculas reguladoras pró-inflamatórias (IWASAKI et al., 2010).

2.3. Imunologia Adquirida

Quando a infecção não pode ser controlada pela imunidade inata e transcende seus limites, uma segunda linha de defesa é necessária para conter o patógeno. Portanto, para combater a ampla gama de patógenos que o indivíduo os linfócitos, que correspondem as células do sistema imune adquirido, precisam ser capazes de reconhecer uma grande variedade de antígenos de bactérias, vírus e de outros organismos causadores de doenças. Um antígeno corresponde a qualquer molécula ou parte de uma, que é especificamente reconhecida por proteínas de reconhecimento altamente especializados dos linfócitos (GOLDMAN et al., 2008).

2.3.1. Linfócitos

Os linfócitos são células responsáveis pelo centro da imunidade adquirida e das defesas do organismo. Nessa classe, existem três categorias de células: a *Natural Killer*, que participam da imunidade inata, os linfócitos T, que são os reguladores da imunidade adaptativa e responsáveis pela imunidade celular, e os linfócitos B, que são os responsáveis pela produção de anticorpos (LAROSA, et al., 2008).

Essas células podem ser tanto encontradas nos órgãos linfoides do organismo, como no sangue e espalhadas nas superfícies mucosas. Apresentam diversas subpopulações que não podem ser identificadas pela sua estrutura, devido sua aparência uniforme. Elas se diferenciam pelas suas moléculas de superfície e seu comportamento. Cada uma das moléculas apresenta uma denominação funcional ou química e atualmente o sistema de nomenclatura fornece números sequenciais para todas as moléculas: CD4, CD8, CD16 e assim por diante (IZCUE et al., 2009).

As estruturas mais importantes da superfície de um linfócito, são os receptores de antígenos, denominados como TCR ou BCR. Eles são muito variáveis com relação a sua especificidade antigênica, permitindo que cada indivíduo desenvolva respostas imunes contra uma grande diversidade de patógenos (BUSSLINGER et al., 2004). O CD3 é o nome dado as proteínas do TCR que transmitem o sinal do receptor para o linfócito T e por isso, estão presente em todos os linfócitos T. O CD4 é um receptor para moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

de classe II das células apresentadoras de antígenos, que reconhecem os antígenos exógenos processados. Já o CD8, é expresso somente nos linfócitos que combatem células anormais, chamados de linfócitos T citotóxicos. Ele corresponde a receptores para moléculas do MHC de classe I (NEEFJES et al., 2011).

Os linfócitos possuem proteínas de superfície com diferentes funções fisiológicas, entre elas estão enzimas, proteínas transportadoras, e muitos receptores. Os receptores são necessários para que ocorra a comunicação com as células vizinhas. Essas células possuem receptores para citocinas, anticorpos, sistema complemento. Além disso, possuem as moléculas de adesão, que incluem integrinas, selectinas, superfamília das imunoglobinas, CD58 e CD2 (TIZARD, 2014).

A produção de novos linfócitos se dá nos tecidos linfóides especializados, os tecidos linfóides centrais, os quais são representados principalmente pela medula óssea para a maioria das células B e o timo para maioria das células T (MURHY, 2014).

2.3.1.1. Linfócitos B

A maturação dos linfócitos B ocorre na medula óssea e quando já maturados entram na circulação e migram para os órgãos linfóides secundários (LEBIEN et al., 2008). As imunoglobulinas IgM e IgD são as responsáveis pelo reconhecimento de antígeno dessas células, e são conhecidas por BCR. As imunoglobulinas se diferenciam em 5 por suas diferentes cadeias pesadas, sendo elas IgG, IgD, IgE e IgM, e todas elas apresentam uma porção variável que determina a especificidade de ligação ao antígeno (MCHEYZER-WILLIAMS et al., 2003).

Os linfócitos B são os responsáveis pela imunidade do tipo humoral, que é a produção e liberação de anticorpos que tem por objetivo neutralizar e até destruir os antígenos contra os quais foram gerados. Os processos de ativação dessas células começam com o BCR ligando-se a um epítipo antigênico, e por consequência o desencadeamento de uma sequência de eventos intracelular (LEBIEN et al., 2008).

Os linfócitos B funcionam também como apresentadoras de antígenos, a partir do momento que internalizam e processam o antígeno ligado ao receptor BCR. Os peptídeos formados pelo processamento são expostos na membrana, ligados às moléculas MHC de classe II e são então apresentados para os Linfócitos T CD4 (MCHEYZER-WILLIAMS, et al., 2003).

Alguns linfócitos B permanecem vivos como células de memória, proliferam e formam os centros germinativos. As células de memória são selecionadas pela sua capacidade de ligação ao antígeno, e por envio de sinais aos linfócitos T, a apoptose é impedida nessas células. Esses linfócitos B de memória dependem de BCR funcional para sobreviver, sugerindo que uma ligação constante aos antígenos de baixa afinidade os mantém vivos (LEBIEN et al., 2008).

2.3.1.2. Linfócitos T

O processo de maturação dos linfócitos T está ligado a expressão de um receptor de célula T funcional e dos seus co-receptores CD4/CD8. Esse processo ocorre no timo e depois de maturados migram pela corrente sanguínea (PARKIN et al., 2001). Ainda na etapa de maturação, os linfócitos T passam por um processo de seleção clonal que os garante como tolerantes aos próprios antígenos, mas capazes de reconhecer antígenos estranhos ao organismo quando apresentados pelo MHC próprio (BHANDoola et al., 2007). Eles só reconhecem antígenos já processados e que são apresentados por moléculas MHC na superfície das células apresentadora de antígeno.

Existem diversos subtipos de linfócitos T efetores descritos, entretanto os dois principais são os auxiliares e os citotóxicos, que apresentam as moléculas CD4 e CD8 respectivamente. Os linfócitos T CD4 são responsáveis por comandar outras células da resposta imune no momento da expulsão do patógeno, além de atuarem na ativação de linfócitos B, macrófagos ou até mesmo dos linfócitos T CD8. Já os CD8 tem a responsabilidade principalmente de controlar as respostas antivirais além de possuírem uma resposta antitumoral (PARKIN et al., 2001).

2.3.1.2.1. Linfócitos T Citotóxicas CD8

Esses linfócitos reconhecem os antígenos intracitoplasmáticos que são apresentados por moléculas MHC de classe I, que são expressas por praticamente todas as células nucleadas. As principais células reconhecidas por linfócitos T CD8 são as infectadas por vírus ou tumorais (PARKIN et al., 2001). Quando se adere à célula alvo, os linfócitos T CD8 proliferam e, em um encontro posterior, podem eliminar por citotoxicidade qualquer célula que apresente esse antígeno específico. Essas células são responsáveis por induzirem a apoptose na célula alvo pela ação de suas moléculas citotóxicas efetoras, como as perforinas e granzimas (PARISH et al., 2009).

2.3.1.2.2. Linfócitos T auxiliares (Th) CD4

As principais subpopulações CD4 efetoras são atualmente distinguidas como Th1, Th2, Th17 e Tfh e Treg (MURPHY, 2014). Essas subpopulações são diferenciadas de acordo com o padrão de citocinas que elas secretam, e consequentemente, diferentes respostas efetoras (BRADLEY et al., 2003).

As células Th1 são responsáveis pelo auxílio do controle de bactérias, que causam infecções intravesiculares em macrófagos. Quando uma célula Th1 reconhece o antígeno bacteriano apresentado na superfície de um macrófago infectado, ele vai interagir com a célula infectada para ativá-la ainda mais, estimulando assim a atividade bactericida dos macrófagos, com o objetivo de permitir que eles matem a bactéria intracelular. A diferenciação dessas células é induzida pela interleucina 12 em conjunto com interleucina 18. Quando ativados, os Th1 secretam IL-2, Interferon- γ , Fator de Necrose Tumoral e linfotóxina. Os linfócitos Th1 geram respostas imunes do tipo celular, dessa forma protegendo o organismo contra microrganismos intracelulares (ZHU et al., 2010).

A subpopulação de células importantes nas respostas imunes humorais são as células Th2, que produzem interleucina 4, interleucina 5, interleucina 6 e interleucina 10, facilitando a produção de anticorpos (PARKIN et al., 2001). As respostas dos linfócitos Th2 estão associadas à imunidade aumentada contra agentes parasitários.

A terceira e mais recente subpopulação de células T, são os chamados linfócitos Th17, que são efetores e importantes na proteção contra infecções por microrganismos extracelulares. Essa nova subpopulação começou a ser descrita e elucidada com a descoberta da interleucina 23 que, juntamente com a IL-1 e IL-6 pode induzir o desenvolvimento de doenças auto-imunes por seu papel pró-inflamatório e indutor da diferenciação e ativação dos Th17 (WAITE et al., 2012). Os Th17 produzem IL-22, IL-26 e outras citocinas efetoras da família IL-17 (CHEN et al., 2007).

As células Th17 surgem quando as citocinas IL-6 e o TGF- β estão presentes e há a ausência de IL-4 e IL-12 (MURPHY, 2014), onde a IL-6 produzida na fase aguda de um processo inflamatório inibe a geração das células reguladoras induzidas por TGF- β , o qual permite a proliferação das células Th17, visto que esta é uma citocina responsável pela inibição de IFN- γ , favorecendo a expressão de receptores para IL-23 (MARGAN et al., 2006). Esse fato sugere que a resposta a IL-23 induzida por IL-6 e TGF- β sirvam como um fator que favorece a sobrevivência de células Th17 (BETTELLI et al., 2006).

2.4. Citocinas

As citocinas são as principais responsáveis pela comunicação celular. São polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, que podem variar entre 8 e aproximadamente 30kDa. Podem ser produzidas tanto no local da lesão como por células do sistema imune, a partir de ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos. Essas proteínas são armazenadas na forma de moléculas pré-formadas, atuando principalmente de forma parácrina, autócrina e endócrina (LIN et al., 2000). As citocinas se assemelham em suas atividades, portanto ações semelhantes podem ser provocadas por diferentes citocinas. Elas possuem receptores específicos que, quando ligados, ativam mensageiros intracelulares que vão regular a transcrição gênica. Normalmente essas substâncias são formadas em cascatas, ou seja, uma citocina estimula sua célula-alvo a produzir mais citocinas (CURFS et al., 1997). Podem ser caracterizadas tanto como pró-inflamatórias, com o objetivo de aumentar a resposta inflamatória, quanto anti-inflamatórias, visando

atenuar a resposta inflamatória. Elas influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e a sobrevivência da célula, bem como regulam a produção e a atividade de outras citocinas (CURFS et al., 1997).

Devido suas atividades nos organismos, as citocinas se tornam necessárias para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão. Entretanto, a presença em excesso das substâncias pró-inflamatórias pode manifestar-se com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos (LIN et al., 2000).

A classificação das citocinas não pode ser realizada baseando-se em sua célula de origem ou função biológica, portanto elas foram agrupadas em interleucinas numeradas de 1 a 35, fatores de necrose tumoral, quimiocinas, interferons e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBURN et al., 2002).

2.5. Interleucina 17

A IL-17A é uma citocina classificada como pró-inflamatória, secretada principalmente pelos linfócitos Th17. Estudos apontam que as células Th17 não são as únicas a secretarem essa interleucina, visto que foi detectada IL-17 em camundongos sem linfócitos B e linfócitos T. Sugere-se que existe um grupo de células do sistema imune inato que são produtoras de IL-17 (UHLIG et al., 2006). Foi descrita pela primeira vez em 1995 como pertencente a família das citocinas, chamada IL-17 (MOSELEY et al., 2003). Também nessa família foram identificados outros cinco membros, (IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F), que atuam como promotores de infiltração celular e promotores de expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias (DONG, et al., 2006).

A proteína IL-17A é produto de um gene o qual possui 150 aminoácidos, enquanto seu peso molecular é de 15kDa e é secretada como uma glicoproteína homodimerica unida por pontes dissulfeto com um peso total entre 30 e 35kDa (MOSELEY et al., 2003). Ela apresenta uma similaridade entre 20 e 50% com as demais IL-17, porém é mais similar a IL-17F, evidenciado pelas suas funções biológicas e pesos moleculares similares (DONG et al., 2003).

O receptor para IL-17 é denominado IL-17R e representa uma proteína transmembrana de aproximadamente 130kDa, distribuída em grande quantidade nos tecidos. Uma vez unida a seu receptor de membrana, as vias de MAP quinases são ativadas e ocorre a ativação dos fatores de transcrição, os quais regulam positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-17F, IL-8, TNF- α , entre outras (SHALOM-BARAK et al., 1998). Por fim, há o recrutamento de neutrófilos no sítio da infecção aguda e o favorecimento dos efeitos inflamatórios de certas doenças autoimunes (STARK et al., 2005).

A IL-17A vem sendo descrita como uma citocina pró-inflamatória, que atua em diversos tecidos do organismo, envolvendo-se no desenvolvimento de autoimunidade, inflamação e alguns tumores (TIZARD, 2014). Foi identificado que seu principal papel biológico é a ativação e expansão rápida de neutrófilos durante um processo infeccioso (STARK et al., 2005).

Embora a família das IL-17 tenha sido relacionada com doenças inflamatórias, é importante ressaltar que sua principal função é na ação contra patógenos (AUJLA et al., 2008). A indução de IL-17A em resposta a vários patógenos extracelulares é dependente de IL-23, e leva a mobilização de linfócitos T CD4 e CD8 (HAPPEL, et al., 2003). Alguns estudos apontam um papel importante no controle da infecção por parasitas extracelulares, evidenciando a produção de IL-17A por células TCD4 de forma dependente da IL-23, induzida por células apresentadoras de antígenos, favorecendo o recrutamento de neutrófilos, dessa forma sugerindo ter um papel importante na eliminação e controle do crescimento de microrganismos (WU et al., 2007).

Estudos recentes mostram que a interleucina 17 está envolvida em amplificar a ligação entre a inflamação crônica e a destruição da matriz extracelular, e, portanto, envolvidas em doenças com manifestação de inflamação induzida por danos. Nesse sentido, apresentam resultados positivos obtidos a partir de ensaios clínicos que usaram como ferramenta para tratamento, a inibição da atividade da IL-17 (MIOSSEC et al., 2012). Além disso, desempenham papéis de proteção na defesa do hospedeiro contra patógenos em células epiteliais. Em uma fase inicial de infecção por patógeno, a IL-17A juntamente com a IL-17F, são importantes no controle da carga bacteriana, ao passo que mais tarde, a IL-17A deixa de agir com

tanta intensidade, mas ainda assim é efetora. Essa citocina também contribui para a produção de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias sob a presença de patógenos extracelulares. Portanto um defeito na produção de IL-17 resulta em um aumento da disseminação bacteriana, correlacionada com a redução de mediadores inflamatórios e o não recrutamento de neutrófilos (JIN et al., 2013).

A produção de proteínas recombinantes tem sido uma um área extremamente ampla, com fins terapêuticos, veterinários e agropecuários, e tem se mostrado eficaz tecnologicamente (CHEN et al., 2012). O sistema de expressão ideal depende de qual proteína se tem interesse expressar. O sistema de expressão em *Escherichia coli* segue sendo o principal sistema bacteriano a ser escolhido (GORDON et al., 2008). Esse microrganismo é amplamente caracterizado geneticamente e apresenta como vantagens para o processo seu rápido crescimento, sua densidade celular é facilmente alcançada, seu cultivo é realizado em meios comercialmente disponíveis e o processo de transformação com o DNA exógeno é simples (ROSANO et al., 2000).

Produção recombinante dessa interleucina é uma importante forma de estudar a modulação da resposta imune em infecções por diferentes agentes, sendo que a sua utilização fica inviável de forma comercial devido ao alto custo, portanto a produção deste insumo poderia viabilizar inúmeras pesquisas no estudo da modulação imunológica por esta citocina.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

O presente trabalho visou realizar a clonagem, expressão e caracterização da interleucina 17A de *Bos taurus*, na forma recombinante em *E. coli*.

3.2. Objetivos específicos

- Amplificar a sequência completa do gene da interleucina 17A e cloná-la em vetor pAE;
- Expressão da IL-17 em cepa de *Escherichia coli*;
- Otimização do tempo de indução da expressão;
- Avaliação do rendimento na expressão em diferentes cepas;
- Caracterização da proteína recombinante.

4. Metodologia

4.1. Desenho *in silico* dos iniciadores

Para obter a sequência, foram construídos *in silico* oligo iniciadores (*primers*) no software Vector NTI Advance™ (Invitrogen), com base na sequência depositada no GeneBank (AF412040).

	Sequência	TM
Forward	5' GGA CTC GAG ATG GCT TCT ATG AGA AC 3'	58,4 °C
Reverse	5' CGG AAT TCA GCC AAA TGG CGG ACA A 3'	62,2 °C

Tabela 1 - Sequência dos oligo iniciadores utilizados para obter a sequência da IL-17A.

4.2. Amplificação da sequência da IL-17 a partir de cDNA de esplenócitos bovinos

A técnica de PCR foi realizada a partir de amostras de cDNA de esplenócitos bovinos, para a amplificação do gene da IL-17A. A técnica foi realizada utilizando

Taq DNA Polimerase, com 35 ciclos de 94 °C por 1 min, temperatura de anelamento em gradiente de 51 °C, 56 °C e 62 °C por 1 min, e 72 °C por 1 min.

4.3. Clonagem no plasmídeo pAE do gene IL-17A

A clonagem foi realizada utilizando o plasmídeo pAE, que se encontra na Biblioteca de vetores do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), o qual é utilizado amplamente para expressão de proteínas em *Escherichia coli*. Sua regulação é baseada pelo promotor T7, possui resistência ao antibiótico ampicilina e responsável por adicionar 6 aminoácidos de histidina (6xHis) na região N-terminal a proteína produzida, permitindo posteriormente a purificação em colunas de níquel.

Tanto o produto obtido através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), quanto o vetor de expressão foram submetidos a restrição com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (BioLabs) separadamente por 18h a 37 °C, a fim de tornar suas extremidades coesivas. A ligação destas duas partes foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) por 26 °C por 1h.

O produto da ligação foi utilizado para transformação da cepa *E. coli* TOP10F, promovendo a propagação do plasmídeo. A transformação foi realizada segundo a técnica de transformação por choque térmico, onde foi utilizado 100 µL de CaCl₂ (100mM), uma colônia de placa contendo *E. coli* TOP10F em meio LB (*Luria Bertani*) ágar com 24h e plasmídeo/inserto. Os componentes em microtubo permaneceram em banho de gelo por 15min, seguido de uma incubação de 1min a 42 °C e posteriormente 2min novamente em gelo, para que ocorra o choque térmico através destas oscilações de temperatura. A transformação foi cultivada em meio *Luria Bertani* ágar adicionado com o antibiótico ampicilina (100 µg/mL). O cultivo foi mantido por 16h a 37 °C. As colônias que se desenvolveram na placa foram cultivadas em 1 mL de meio LB líquido com ampicilina, por 16h a 37 °C. Os cultivos foram centrifugados por 3min a 12.000 x g, e a partir do *pellet* de células formado, foi realizada a técnica *MicroPrep* (JOUGLARD et al. 2002), uma extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio. O resultado foi visualizado em gel de agarose 1%, 100 V por 1h.

4.4. Seleção dos clones e confirmação da clonagem

Os clones que apresentaram tamanho superior quando comparado com o vetor de origem, foram cultivados em 10 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina, por 16h a 37 °C e agitação de 150rpm. A extração plasmidial foi realizada de modo adaptado de SAMBROOK; RUSSEL (2001), através de lise alcalina. Para confirmar a presença do inserto nos plasmídeos recombinantes, foi realizada a técnica de PCR com os mesmos parâmetros já citados, e posteriormente o produto foi digerido com a enzima *KpnI*. Depois de confirmado por ambas as técnicas a amostra foi enviada para sequenciamento pela a empresa ACTGene análises - POA.

4.5. Expressão da rIL-17A

A construção já confirmada pelo sequenciamento foi utilizada para transformação das cepas de *E. coli* de expressão Rosetta™, Ril, Plyss, C41 e C43 pelo mesmo método descrito anteriormente. Inicialmente a expressão foi realizada em pequeno volume, partindo de um pré inóculo de 2 mL de meio LB líquido adicionado de ampicilina 100µg/mL para todos os cultivos e clorofenicol 100µg/mL somente para as cepas Rosetta™, Ril e Plyss, a 37 °C por 18h com agitação de 150 rpm. Posteriormente o volume do cultivo foi aumentado para 10 mL contendo os mesmos antibióticos. Os cultivos ficaram incubados as mesmas condições anteriores até atingirem a densidade óptica (D.O. 600nm) de 0,6 (fase log) para iniciar a indução da expressão da proteína recombinante. Foram coletadas aliquotas dos cultivos no período de 0, 1, 2, 3, 4 e 24 horas, para avaliação do melhor tempo de expressão. Após 24 horas os cultivos foram centrifugados a 9.000 x *g* por 3min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido eluído em tampão PBS (*phosphate buffered saline*). As amostras das expressões foram preparadas com tampão redutor, desnaturadas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na concentração de 15%. A indução foi realizada com IPTG 1mM (Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosídeo).

Somente a cepa Rosetta™ apresentou expressão da proteína de interesse. O plasmídeo pAE/IL-17 foi inserido novamente na cepa escolhida pelo mesmo método

já descrito de transformação por choque térmico. A transformação foi propagada em um pré-inóculo de 150 mL de meio LB líquido acrescido de clorofenicol e ampicilina na proporção de 1:1, cultivado por 16h a 37 °C com agitação de 150rpm. O pré-inóculo foi transferido para 350 mL de meio LB líquido, totalizando 500 mL de cultivo final acrescido dos antibióticos na mesma proporção, que permaneceu em agitação até atingir a D.O. de 0,6 (D.O.₆₀₀), correspondendo a metade da fase *log* de crescimento bacteriano. Assim, após a retirada de amostra de 1 mL, o cultivo foi induzido com IPTG para concentração final de 1mM, a 37 °C com agitação constante de 150 rpm. Após 3h houve nova retirada de 1 mL do cultivo, visto que esse foi o tempo com maior expressão.

4.6. Purificação da rIL-17A

O *pellet* celular dos cultivos, foi obtido através de centrifugação por 10 min a 9.000 x *g* e eluído em 25 mL de tampão de lise Akta Wash (NaH₂PO₄ 0,2M; NaCl 0,5M; Imidazol 10mM) e assim a amostra foi sonicada por 10min de 60Hz com pulso de 6 segundos. Logo após a amostra foi incubada a 4 °C com lisozima 100 µg/mL por 1h sob agitação e posteriormente centrifugada novamente por 15min a 9.000 x *g* e o sobrenadante obtido foi armazenado a 4 °C. O *pellet* resultante foi ressuspenso em 25 mL de tampão de solubilização Akta Wash com Uréia (NaH₂PO₄ 0,2M; NaCl 0,5M; Uréia 8M; Imidazol 10mM) e incubado a 4 °C por 3h sob agitação. Houve uma nova centrifugação a 9.000 x *g*, 4 °C por 10min, onde o sobrenadante obtido foi armazenado a 4 °C para posteriormente ser purificado. As amostras resultantes da lise foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida de 15%.

As amostras nos tampões de solubilização, resultante das centrifugações, foram filtradas com membrana com *cut off* de 0,8 µm para a retirada de restos celulares antes da purificação. Após a filtração, as amostras foram submetidas à cromatografia de afinidade com o uso da coluna de níquel HisTrap TALON®, a qual liga os resíduos de histidina presentes no *tag* da proteína recombinante, a qual é inserida pelo vetor pAE. Após este processo as amostras foram verificadas em gel de poliacrilamida.

A concentração da proteína foi realizada utilizando tubos de dialíse, que são membranas semipermeáveis seletivas para moléculas maiores, como proteínas. Pelo princípio de osmose a proteína foi mantida no tubo, enquanto as outras moléculas menores conseguiram atravessar as membranas.

4.7. Caracterização da rIL-17

Para a caracterização da proteína recombinante, foi utilizada a técnica de *Dot blot*. As amostras da proteína foram colocadas na membrana de nitrocelulose a membrana foi bloqueada com leite em pó 5%, diluído em PBS-T (*phosphate buffered saline* + 0,05% de *Tween* 20). Para detecção da *tag* de histidina presentes na proteína recombinante, foi utilizado anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis, por 1h, na diluição 1:5000 em PBS-T. Em seguida a membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti-mouse) conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich), na mesma diluição. Para revelação da reação foi utilizado 0,006 mg de DAB (3,3'-Diaminobenzidina) em solução contendo Tris HCl 50mM, Sulfato de Níquel 0,3% e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

5. Resultados e discussão

5.1. Construção dos iniciadores

O desenho *in silico* foi criado com o *software* Vector NTI Advance™ (Invitrogen), demonstrando a região a ser amplificada (Figura 1), que compreende uma região de 476 pares de base.

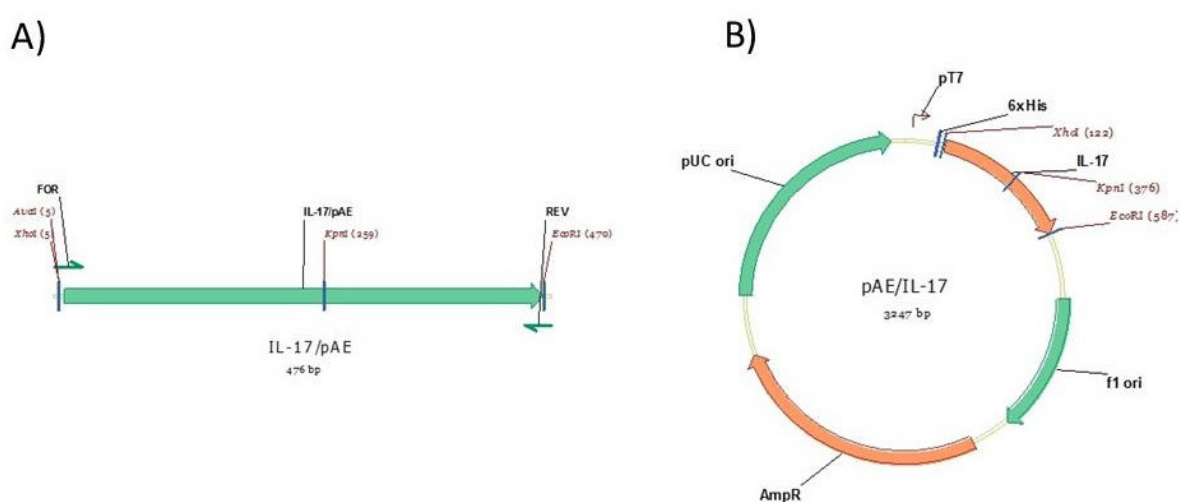


Figura 1 – Gene da IL-17A. Imagem A) Porção a ser isolada utilizando os iniciadores construídos e suas respectivas enzimas de restrição. Imagem B) Construção pAE/IL-17A.

Fonte: Vector NTI Advance™ (Invitrogen).

5.2. A PCR

Ocorreu a amplificação do fragmento esperado, visto que o produto da reação pode ser observado com tamanho esperado de 476pb quando submetido a eletroforese. Foram testadas diferentes concentrações de cDNA com diferentes temperaturas de anelamento (Figura 2), onde os resultados mostram que a amplificação ocorreu com 1µg (concentração) de cDNA nas diferentes temperaturas de 51 °C, 56 °C e 62 °C. Todas as temperaturas testadas se mostraram eficazes para a amplificação da sequência desejada, porém foi necessário utilizar uma maior

quantidade de material genético para a realização da reação em cadeia da polimerase.

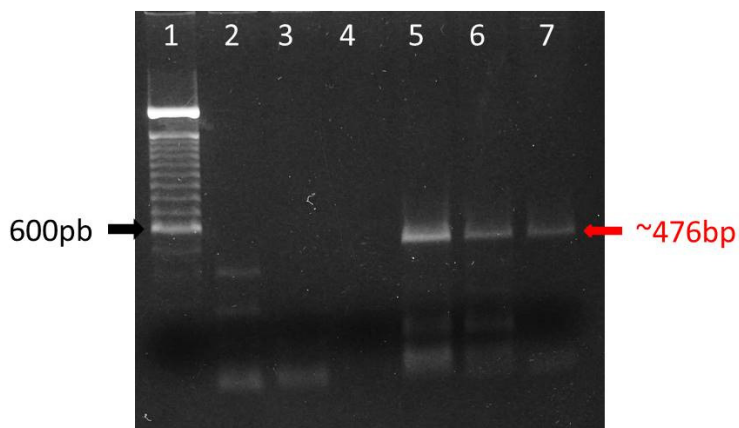


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Produto de amplificação pela reação de PCR das diferentes concentrações de cDNA e temperaturas de anelamento. 1) Marcador *Ladder* 100pb 2) 0,5 µg cDNA a 51 °C 3) 0,5 µg cDNA a 56 °C 4) 0,5 µg cDNA a 62 °C 5) 1 µg cDNA a 51 °C 6) 1 µg cDNA a 56 °C 7) 1 µg cDNA a 62 °C.

Fonte: A autora.

5.3. Clonagem e seleção dos clones

O produto da PCR, juntamente com o vetor, foram submetidos a restrição com as enzimas *EcoRI* e *XhoI* (BioLabs). Com as extremidades já coesas, a ligação foi realizada com T4 DNA Ligase (Invitrogen).

O produto da ligação entre a sequência amplificada de IL-17 no vetor pAE foi transformado em cepa de *E. coli* TOP10F, para identificar em qual dos plasmídeos ocorreu a inserção do gene. Das colônias isoladas foram extraídos plasmídeos (Figura 3).

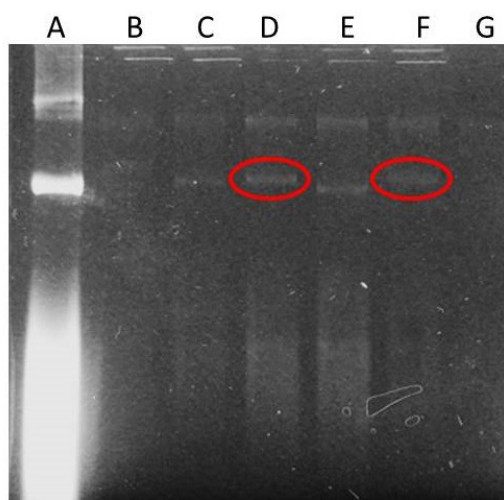


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose de 1% - extração plasmídial. O resultado da extração plasmídial de 6 clones de *E. coli*, que cresceram em meio de cultivo suplementado com ampicilina. A primeira coluna possui o plasmídeo pAE integro, usado como controle para comparar com os demais clones.

Fonte: A autora.

De acordo com a fase de leitura, a calda de histidina, adicionado pelo vetor pAE (conhecido como *fusion tag*) na frente do fragmento da IL-17, facilita o processo de purificação que conta com o reconhecimento da proteína recombinante expressa a partir de anticorpos específicos durante a utilização da coluna de cromatografia de afinidade.

O resultado do gel de agarose sugeriu que houve inserção do gene da IL-17A em duas colônias, que estão representadas pela coluna D e F na figura 3. A inserção do gene de interesse na construção do plasmídeo foi confirmada pela técnica de PCR, utilizando os primers para o gene da IL-17. O produto obtido apresenta o mesmo tamanho do fragmento obtido inicialmente, comprovando a clonagem e inserção correta no plasmídeo (Figura 4). A primeira confirmação da eficácia dos processos de clonagem e transformação foi comprovada pela extração plasmídial que demonstrou resultados de plasmídeos com número de pares de bases superior ao plasmídeo de origem.

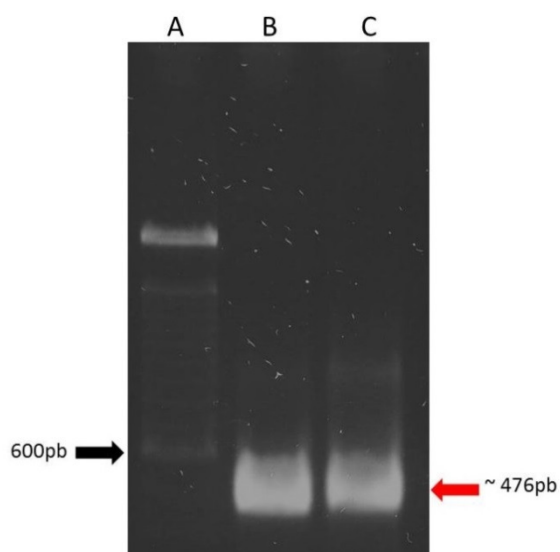


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1% - confirmação dos clones pAE/IL-17A. A) Marcador de peso molecular *Ladder* 100pb B) PCR do clone da coluna D (Figura 3) C) PCR do clone da coluna F (Figura 3).

Fonte: A autora.

5.4. Caracterização

Para caracterizar os plasmídeos extraídos, o produto da PCR foi submetida a restrição com a enzima *KpnI*, visto que o fragmento apresenta um sítio de clivagem para esta enzima, que divide o fragmento em dois menores com 257pb e 219pb (Figura 5). Essa digestão serviu para indicar a presença do inserto esperado no plasmídeo em questão.

O produto da reação de PCR foi encaminhada para realização de sequenciamento para a empresa ACTGene, e o contig formado foi usado na pesquisa através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search*), apresentando 99% de identidade com a sequência do gene da IL-17 de bovinos, com número de acesso AF412040 no GeneBank.

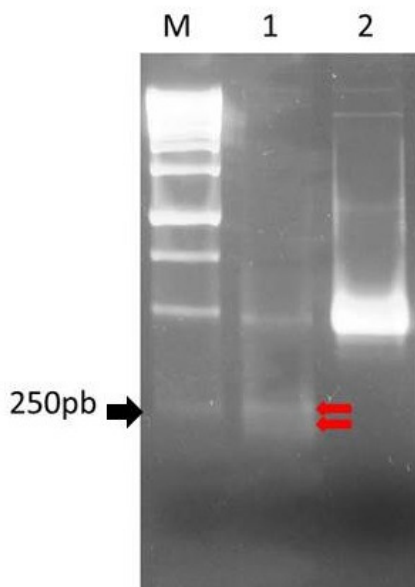


Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose de 1% - digestão do fragmento de IL-17 com *KpnI*. A restrição separa em dois fragmentos menores, sendo um de aproximadamente 257pb e o outro com 219pb. M) Marcador *Ladder 1kb* (Sigma) 1) Produto de PCR digerido com enzima *KpnI* 2) Produto de PCR não digerido.

Fonte: A autora.

5.5. Expressão da rIL-17A

A expressão da proteína recombinante foi testada em 4 cepas diferentes, no entanto a expressão só pode ser visualizada na cepa RosettaTM, principalmente na terceira hora após a indução com IPTG 1mM. Porém pode ser observado a expressão antes mesmo da presença do IPTG 1mM. No gel de poliacrilamida na concentração de 15% pode-se observar a proteína com um tamanho de aproximadamente 35kDa (Figura 6).

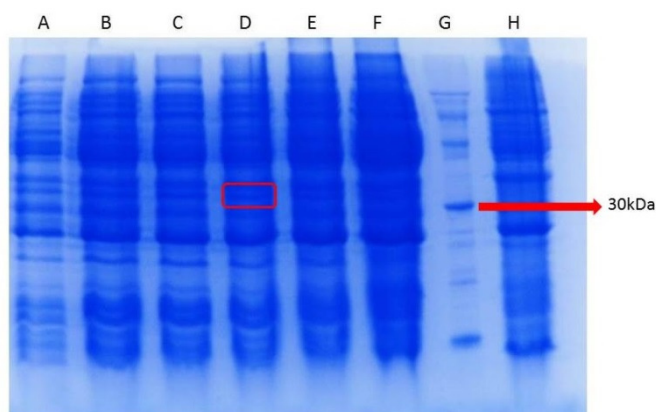


Figura 6 – SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% - expressão da rIL-17A. A) Hora 0 - momento da indução, de B) a E) horas 1, 2, 3 e 4 respectivamente F) Hora 24 G) Marcador H) Rosetta™ não transformada.

Fonte: A autora.

A cepa Rosetta™ demonstrou ser capaz de produzir a proteína de interesse, ainda que com rendimento baixo da mesma. A proteína rIL-17 foi expressa utilizando a cepa Rosetta™ em 500 mL de meio líquido acrescido de antibióticos. Quanto a sua solubilização, a proteína recombinante apareceu tanto em tampão Akta Wash quanto no tampão adicionado de 8M de uréia para (Figura 7).

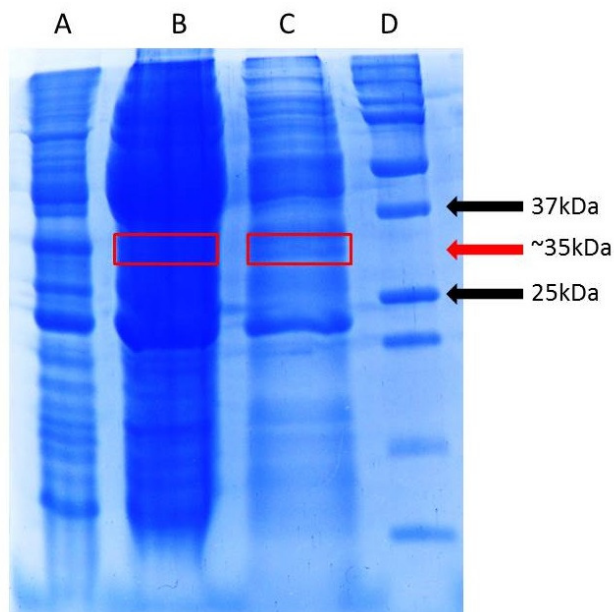


Figura 7 – SDS- PAGE em gel de poliacrilamida 15% - confirmação da expressão de rIL-17 - A) Extrato de E.coli não transformada B) Amostra eluída em Akta Wash C) Amostra eluída em Akta Wash com Uréia D) Marcador de peso molecular.

Fonte: A autora.

Através do resultado da figura 7, pode se observar que a proteína está presente tanto de forma solúvel como na forma de corpos de inclusão, necessitando do agente desnaturante uréia 8M para sua recuperação.

5.6. Purificação

As duas amostras eluídas nos tampões com uréia e sem foram filtradas em depois submetidas ao processo de purificação por cromatografia de afinidade. A figura 8-A ilustra a purificação realizada a partir do tampão sem uréia nas diferentes frações de eluição, mostrando que a proteína pura foi eluída apenas em uma fração com a presença de alguns agregados proteicos. A figura 8-B apresenta os resultados da purificação a partir da amostra eluída em tampão com uréia. Essa purificação evidencia que a proteína pura também foi obtida apenas em uma fração.

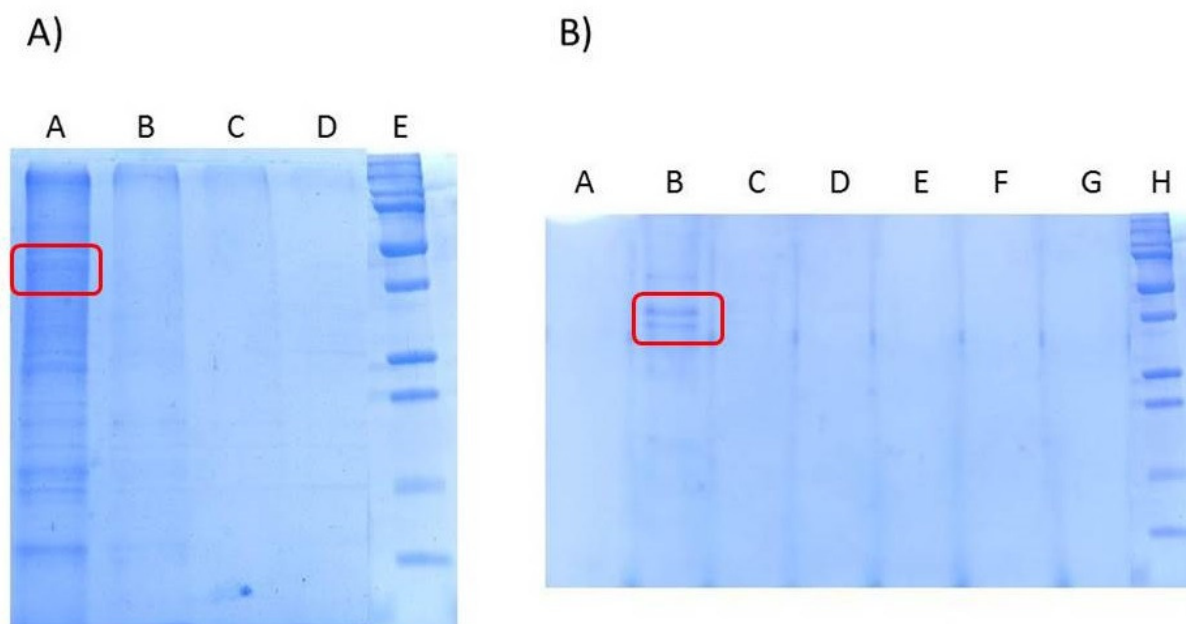


Figura 8 – Purificação da rIL-17A. Imagem A) SDS-PAGE- Gel de poliacrilamida 15% para verificar a purificação da proteína recombinante eluída em tampão Akta Wash. A) 20%; B) 40% C) 60% D) 80% E) Marcador de peso molecular. Imagem B) SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida 15% para verificar a purificação da proteína recombinante eluída em tampão Akta Wash com Uréia 8M. A) 10% B) 40% C) 40% D) 60% E) 80% F) 100% G)100% H) Marcador de peso molecular.

Fonte: A autora.

A proteína foi eluída na fração de 20% quando purificada do tampão Akta Wash, porém esta mesma aparece com a formação de agregados proteicos. Já na amostra eluída no tampão Akta Wash com uréia 8M a proteína aparece na fração de 40% com o tamanho esperado, sem a formação de agregados proteicos.

Os níveis de expressão da proteína ficaram baixos, portanto foi necessário que fosse realizado o processo de concentração das frações purificadas por meio de tubos de dialíse. Os resultados estão ilustrados na figura 9.

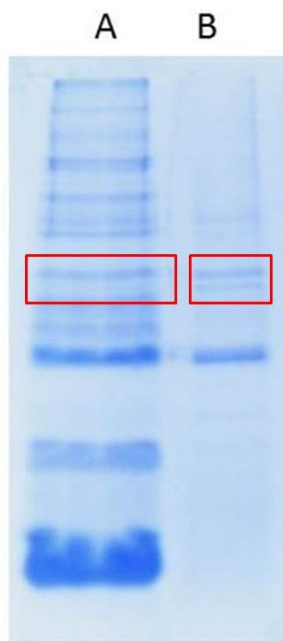


Figura 9 – SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida 15% - resultado das concentrações. A) Amostra purificada e concentrada a partir do tampão Akta Wash; B) Amostra purificada e concentrada a partir do tampão Akta Wash com Uréia 8M.

5.7. Dot Blot

Na membrana de nitrocelulose foram testadas cinco amostras, para identificar em qual a proteína recombinante estava presente (Figura 10).

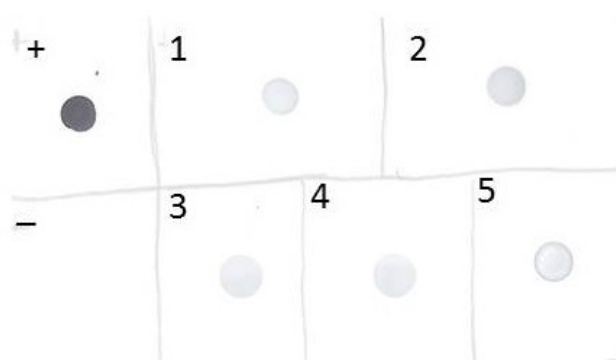


Figura 10 – Membrana de nitrocelulose – resultado Dot Blot. Para controle positivo foi utilizado uma proteína com a cauda de histidina e para o controle negativo um proteína sem calda de histidina. 1) Proteína eluída em tampão Akta Wash ; 2) Proteína eluída em Akta Wash 2; 3) Proteína eluída em Akta Wash com uréia 8M 1; 4) Proteína eluída em Akta Wash com uréia 8M 2; 5) Fração da purificação de 40% (amostra Akta Wash com uréia 8M).

A reação com o anticorpo anti-histidina foi evidente em todas as amostras testadas, comprovando a capacidade do plasmídeo pAE em adicionar a os aminoácidos histidina à proteína recombinante expressa. Portanto o resultado obtido por essa técnica sugere que a proteína obtida é a proteína recombinante de interesse. No entanto ainda é necessário aprimorar a técnica de purificação, e a realização de um *Western Blot*, que vai evidenciar o peso molecular esperado juntamente com o reconhecimento pelo anticorpo anti-histidina.

6. Conclusões e Perspectivas

O presente trabalho apresenta os processos de clonagem, expressão e caracterização do fragmento proteico correspondente ao gene completo da IL-17A, utilizando como sistema de expressão *Escherichia coli* cepa Rosetta™.

A obtenção do fragmento confirmado pelos resultados da PCR, restrição, SDS-PAGE e sequenciamento, apontam que as técnicas empregadas para a construção do plasmídeo pAE/rIL-17A foram eficazes e satisfatórias, bem como os processos de expressão e purificação após a expansão do cultivo da bactéria *E.coli*.

A expressão recombinante dessa proteína no sistema de *E. coli* possibilita o estudo da estimulação da resposta imunológica, podendo também ser utilizada para testes de bloqueio dela mesma e sinalização. Sua atividade será verificada na indução de esplenócitos. Além disso, o estudo de mecanismos referentes as atividades dessa interleucina e sua modulação do sistema imune durante a resposta imune contra patógenos é um objetivo futuro do grupo de pesquisa, visto que este mesmo trabalha com vacinas contra bactérias, vírus e protozoários.

7. Referências

- ABBAS, A. et al. **Imunologia básica**. 4.ed. Rio de Janeiro, 336 p., 2013.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**. v.30, n.1, p.459-489, 2012
- ARANCIBIA, S. et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biological Research**. v.40, n.2, p.97-112, 2007.
- AUJLA, S. et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. **Nature medicine**. v.14, n.3, p.275-281, 2008.
- BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**. v.18, p.767-811, 2000.
- BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**. v.441, p.235-238, 2006.
- BHANDOOLA, A. et al. Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from. **Immunity**. v.26, n.6, p.678-689, 2007.
- BRADLEY, L. Migration and T-lymphocyte effector function. **Corrent opinion in immunology**. v.15, n.3, p.343-348, 2003.
- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**. v.303, n.5663, p.1532-1535, 2004.
- BUSSLINGER, M. Transcriptional control of early B cell development. **Annual review of immunology**. v.22, p.55-79, 2004.
- CERWENKA, A. et al. Natural killer cells, viruses and cancer. **Nature reviews immunology**. v.1, n.1, p.41-49, 2001.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology Advances**. v.30, n.5, p.1102-1107, 2012.

CHEN,Z. et al. Distinct regulation of interleukine-17 in human T helper lymphocytes. **Arthritis and rheumatism**. v.56, n.9, p.2936-2946, 2007.

CRUVINEL, W. et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.55, n.11, p.434-461, 2010.

CURFS, J. et al. A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10, n.4, p. 742-780, 1997.

DELVES, P. et al. The immune system. First of two parts. **The New England journal of medicine**. v. 343, p.37-49, 2000.

DONG, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. **Nature reviews immunology**. v.6, n.4, p.329-333, 2006.

GOLDMAN, A. et al. Immunology Overview. p.1-37, 2008

GORDON, E. et al. Effective high-through put overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. **Protein Expression Purification**. v.62, n.1. p.1-8, 2008.

GORDON, S. et al. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature reviews immunology**. v.5, n.12, p.953-964, 2005.

HAMMAD, H. et al. Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity. **Immunity**. v.43, n.1, p.29-40, 2015.

HAPPEL, K. et al. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. **Journal of Immunology**. v.170, n.9, p.4432-4436, 2003.

HOGAN, S. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**. v.38, n.5, p.709-750, 2008.

ITURRY-YAMAMOTO, G. et al. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revistada Associação Médica Brasileira**. v.47, n.1, p.41-51, 2001.

IWASAKI, A. et al. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**. v.327, n.5963, p.291-295, 2010.

IZCUE, A. et al. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annual review of immunology**. v. 27, p. 313-338, 2009.

JACK, R. et al. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological reviews**. v.59, n.2, p.171-200, 1995

JIN, W. et al. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. **Emerging Microbes & Infections**. v.2, p.1-5, 2013.

JOSSON, F. et al. Mast cells and company. **Frontiers in Immunology**. v.3, p.1-18, 2012.

JUNQUEIRA, L. et al. **Histologia básica**: texto e atlas. 12.ed. São Paulo, 556 p., 2013.

KALESNIKOFF, J. et al. New developments in mast cell biology. **Nature immunology**. v.9, n.11, p.1215-1223, 2008.

KAWAI, T. et al. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**. v.11, n.5, p.373-384, 2010.

KOLACZKOWSKA, E. et al. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews Immunology**. v.13, n.3, p.159-175, 2013.

LAROSA, D. et al. Lymphocytes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 121, n. 2, p. 363-369, 2008.

LEVY, D. et al. Immunity to intestinal parasites: role of mast cells and goblet cells. **Federation Proceedings**. v.42, n.6, p.1750-1755, 1983.

LIN, E. et al. Inflammatory cytokines ad cell response in surgery. **Surgery**. v.127, n.2, p.117-126, 2000.

LUCIANI, A. et al. Lymph node imaging: Basic principles. **European Journal of Radiology**. v.58, n.3, p.338-344, 2006.

MARGAN, P. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**. v.441, n.7090, p.231-234, 2006.

MCHEYZER-WILLIAMS, M. B cells as effectors. **Current Opinion in Immunology**. v.15, n.3, p.354-361, 2003.

MEDZHITOV, R. et al. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Reviews**. v.173, p.89-97, 2000.

MEDZHITOV, R. et al. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**. v.388, n.6640, p.394-397, 1997.

MESQUITA JUNIOR, D. et al. Sistema Imunitário – Parte II - Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.50, n.5, p.552-580, 2010.

MIOSSEC, P. et al. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nature reviews**. v.11, p.763-776, 2012.

MOSELEY, T. et al. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. **Cytokine and Growth Factor Reviews**. v.14, n.2, p.155-174, 2003.

MOSSER, D. et al. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews Immunology**. v.8, n.12, p.958-969, 2008.

MURPHY, K. **Imunologia de Janeway**. 8.ed. Porto Alegre. 868p., 2014.

NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**. v. 11, n. 12, p. 823-836, 2011.

PARISH, I. et al. Diversity in CD8+ T cell differentiation. **Current Opinion in Immunology**. v. 21, n. 3, p. 291-297, 2009.

PARKIN, J. et al. An overview of the immune system. **Lancet**. v.357, n. 9270, p. 1777-1789, 2001.

RAEBURN, C. et al. Cytokines for surgeons. **American Journal of Surgery**. v.183, n.3, p.268-273, 2002.

- RICKLIN, D. et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature immunology**. v.11, n.9, p.785-797, 2010.
- ROSANO, G. et al. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**. v.5, p.1-17, 2014
- SARMA, J. et al. The complement system. **Cell and Tissue Research**. v. 343, n. 1, p. 227-235, 2011.
- SHALOM-BARAK, T. et al. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF- kappa_B. **Journal Biological Chemistry**. v.273, n.42, p.27467-27473, 1998.
- STARK, M. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**. v.22, n.3, p.285-294, 2005.
- TIZARD, I. **Imunologia veterinária**. 9.ed. Rio de Janeiro. 2014. 551p
- UHLIG, H, et al. Differential Activity of IL-12 and IL-23 in Mucosal and Systemic Innate Immune Pathology. **Immunity**. v.25, n2, p.309-318, 2006.
- WAITE, J. et al. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. **International Journal of Inflammation**. v.2012 p.10, 2011.
- WILLART, M. et al. PAMPs and DAMPs in allergy exacerbation models. **Methods Molecular Biology**. v. 1032, p. 185-204, 2013.
- WU, Q. et al. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. **Microbes and Infection**. v.9, n.1, p.78-86, 2007.
- YOKOYAMA, M. et al. The dynamic life of natural killer cells. **Annual review of immunology**. v.22, n.11, p.405-429, 2004.
- ZAWROTNIAK, M. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) – Formation and implications. **Acta Biochimica Polonica**. v.60, n.3, p.277-284, 2013.
- ZHU, J. et al. Differentiation of effector CD4 Tcell populations. **Annual review of immunology**. v. 28, p. 445-489, 2010.