

# Clonagem da Interleucina 6 suína

Natalia Balbinott, Júlia Pires Espíndola, Letícia Gressler, Luiz Carlos Kreutz e Rafael Frandoloso

## Introdução

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina produzida por macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Funcionalmente, a IL-6 possui um amplo espectro de atividades biológicas e, durante a inflamação, induz a produção de proteínas de fase aguda, aumenta a expressão de adesinas endoteliais e promove a diferenciação de monócitos a macrófagos. Durante a patogenia de algumas doenças bacterianas que acometem o trato respiratório dos suínos, em especial da Doença de Glässer, níveis elevados de IL-6 são observados nos fluidos corporais, convertendo esta molécula em um potencial marcador pró-inflamatório. Em razão do importante papel modulador da IL-6, desenvolver novas estratégias para a sua detecção e quantificação converte-se numa estratégia útil para a avaliação de novas moléculas farmacológicas e de vacinas. Com este objetivo, descrevemos neste trabalho, a clonagem do gene que transcreve a IL-6 suína, etapa inicial para o desenvolvimento da IL-6 recombinante.

## Desenvolvimento

Leucócitos mononucleares sanguíneos foram isolados do sangue periférico de suínos (híbrido comercial Large White × Landrace) mediante um gradiente de densidade composto por Ficoll (Amersham). A partir destas células, realizou-se a extração do RNA total utilizando o kit RNeasy<sup>®</sup> Mini (Qiagen) e, em seguida, procedeu-se a transcrição do RNA à cDNA utilizando o kit SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). O gene que transcreve a IL-6 suína foi amplificado mediante uma PCR contendo os primers IL-6F<sup>(5'-ATTAGGGATCCATGAAGTCCCTCTCCACAAGC-3')</sup> e IL-6R<sup>(5'-TGGCAGAAGCTTCTACATTATCCGAATGGCCCTC-3')</sup>, desenhados a partir da sequência NM\_214055.1 depositada no GenBank. O produto de DNA amplificado foi inserido no plasmídeo pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vector (Promega) através da ação da enzima T4 DNA ligase e, a continuação, o plasmídeo recombinante foi transformado quimicamente em células competentes de *Escherichia coli*, cepa TOP10. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de ágar Luria Bertani (LB) contendo 100 µg/ml de ampicilina e cultivadas overnight a 37°C. No dia seguinte, o DNA plasmídeo de 10 clones bacterianos foram analisados por PCR, digestão enzimática (BamHI e HindIII) e mediante sequenciamento de DNA, utilizando os primers pUC/M13-F e pUC/M13-R (Promega). Neste estudo, demonstramos que o sistema desenhado para a amplificação do gene IL-6 (primers IL-6F e IL-6R) suíno foi efetivo e rendeu um fragmento de 600 pares de base, conforme previsto na análise *in silico* [softwares Gen Construction Kit e Gene Inspector (Textco Biosoftware Inc)] realizada previamente. Os sítios de restrição incluídos nos extremos 5' e 3' do gene IL-6 foram eficientemente digeridos pelas enzimas BamHI e HindIII, indicando que a inclusão de 6 nucleotídeos externamente ao sítio de restrição promoveu uma superfície de apoio adequada para a ação das enzimas. O sequenciamento do DNA plasmídeo revelou que a sequência nucleotídica clonada possui homologia de 99% quando comparada com a sequência NM\_214055.1 e, que os sítios de corte foram incluídos no mesmo marco de leitura do gene IL-6, permitindo sua posterior clonagem dentro de um plasmídeo de expressão de

proteína com os mesmos sítios de restrição. Nossos resultados, embora preliminares, nos permitem dar seguimento ao processo de desenvolvimento da IL-6 suína recombinante (IL-6r) e, as próximas etapas a serem realizadas consistem em: inserir o gene clonado dentro do vetor de expressão pET-20a; expressar a IL-6r em células de *E. coli* cepa ER2566; e, otimizar o processo de purificação da proteína recombinante por cromatografia líquida de proteína.

### **Considerações finais**

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a correta clonagem do gene IL-6 suíno, primeira etapa do desenvolvimento da IL-6 recombinante. A obtenção da IL-6r nos permitirá desenvolver testes de diagnósticos desenhados para a detecção e quantificação da IL-6, auxiliando no diagnóstico de inflamações subclínicas e na avaliação de produtos fármacos/biológicos em suínos.

### **Referências bibliográficas**

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*: Elsevier Brasil, 2015.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J *et al.* IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 2000;**1**:510-4.

Fossum C, Watrang E, Fuxler L *et al.* Evaluation of various cytokines (IL-6, IFN-alpha, IFN-gamma, TNF-alpha) as markers for acute bacterial infection in swine-a possible role for serum interleukin-6. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;**64**:161-72.

Frndoloso R, Martinez-Martinez S, Rodriguez-Ferri EF *et al.* Haemophilus parasuis subunit vaccines based on native proteins with affinity to porcine transferrin prevent the expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pigs. *Clin Dev Immunol* 2013;**2013**:132432.