



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ATIVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES CANINAS
POR INTERLEUCINA-2 E INTERLEUCINA-12
RECOMBINANTES HOMÓLOGAS**

ANDRÉA MENDES PEREIRA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

ATIVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES CANINAS POR
INTERLEUCINA-2 E INTERLEUCINA-12 RECOMBINANTES
HOMÓLOGAS

ANDRÉA MENDES PEREIRA

Orientador: Geraldo Gileno de Sá Oliveira

Dissertação apresentada para
Obtenção do Grau de Mestre
em Patologia, área de
concentração em Patologia
Experimental

Salvador – Bahia – Brasil
2006

S.H. 31.7.2006
142000

LIDBI
M. 100 - 4.3.2006
142000

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

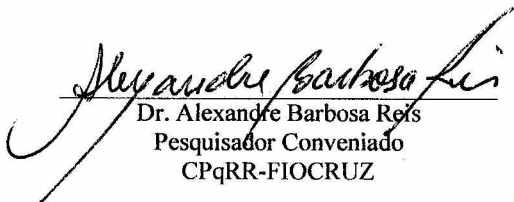
P436a	<p>Pereira, Andréa Mendes Ativação de células mononucleares caninas por interleucina-2 e interleucina-12 recombinantes homólogas [manuscrito] / Andréa Mendes Pereira. - 2006. 101 f. : il. ; 30 cm.</p>
	<p>Datilografado (fotocópia).</p>
	<p>Mestrado (dissertação) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.</p>
	<p>Orientador: Prof. Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira, Laboratório de Patologia e Biointervenção.</p>
	<p>1. Interleucina-2. 2. Imunidade celular. 3. Interferon gama. 4. Cão. I.Título.</p>
	<p>CDU 577.21:599.742.1</p>

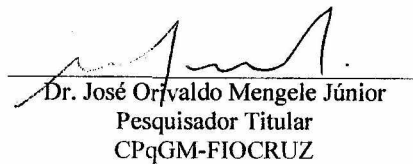
**"ATIVAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES CANINAS POR INTERLEUCINA-2 E
INTERLEUCINA 12 RECOMBINANTES HOMÓLOGAS"**

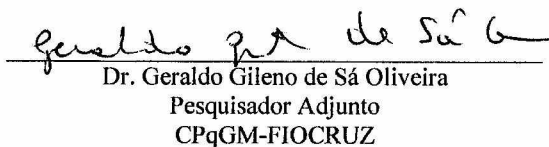
ANDRÉA MENDES PEREIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Alexandre Barbosa Reis
Pesquisador Convênio
CPqRR-FIOCRUZ


Dr. José Orivaldo Mengele Júnior
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ


Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Pesquisador Adjunto
CPqGM-FIOCRUZ

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz com recursos financeiros do Programa RENORBIO (MCT), do Programa INOVABIO (FINEP) e do CNPq.

Aos que, mesmo fisicamente distantes,
me confortam e incentivam
incondicionalmente:

meus pais, Altamiro e Auxiliadora
meus irmãos, Ayrton e Elizabeth

meu melhor amor, Francesco

e meu maior fruto, Juan.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente ao **Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira**, pelo exemplo de conduta profissional como investigador científico e por sua orientação comprometida e encorajada. Estendo minha autêntica gratidão ao **Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho**, pela confiança em mim genuinamente depositada, pelo acolhimento no LPBI e pela análise crítica deste estudo em todas as suas etapas.

Ao **Dr. Washington Luís Conrado dos Santos** e **Dra. Patrícia Sampaio Veras**, pelas valiosas sugestões e incentivos durante a realização deste trabalho.

À **Lenita Ramires dos Santos**, pelo apoio no planejamento, execução e análise de diversos experimentos aqui descritos, em especial nas etapas de clonagem e expressão de proteínas recombinantes.

Ao **Dr. Yang-Fu Chang**, pela doação do vetor de clonagem utilizado na elaboração de uma das construções recombinantes aqui descritas.

Ao **Dr. Oswaldo Pompilho** e sua equipe, pela prestimada colaboração no sequenciamento das construções recombinantes obtidas neste estudo.

À **Fundação Oswaldo Cruz**, em especial ao CPqGM e ao CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório), pelo incentivo ao aprimoramento da minha formação profissional.

Ao **Curso de Pós-Graduação em Patologia** da Universidade Federal da Bahia pelas orientações acadêmicas e pelos ensinamentos proporcionados.

E, finalmente, a todas as pessoas que participaram da realização deste estudo através das inúmeras contribuições técnicas e administrativas indispensáveis na execução e interpretação dos experimentos e na elaboração do manuscrito:

Ana Maria Fiscina (Biblioteca-CPqGM)

Antonio Carlos Nascimento (Canil-CPqGM)

Elivani Sacramento de Jesus (LPBI-CPqGM)

Fabienne Petitinga de Paiva (Biotério-CPqGM)

Flavia Nery (Importação-FIOTEC)

José Fernando Oliveira Costa (LETI-CPqGM)

Marcio da Silva Rodrigues (LPBI-CPqGM)

Matheus Santos de Sá (LETI-CPqGM)

Micely del Rei Hermida (LPBI-CPqGM)

Sérgio Vasconcelos (LPBI-CPqGM)

Virgínia Maria Góes da Silva (LPBI-CPqGM)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL	18
2.1.1 Aspectos gerais	18
2.1.2 Aspectos clínicos no ser humano	20
2.1.3 Aspectos clínicos no cão	21
2.2 A RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL	23
2.2.1 Aspectos gerais da imunidade à <i>Leishmania</i>	23
2.2.2 A interleucina 2 e a modulação da resposta imune na leishmaniose visceral	28
2.2.3 A interleucina 12 e a modulação da resposta imune na leishmaniose visceral	32
2.2.4 O sinergismo de IL-12 e IL-2 na resposta imune	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 PRODUÇÃO DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE EM <i>Escherichia coli</i>	37
4.1.1 Obtenção e seqüenciamento da construção codificando o cDNA de IL-2 canina	37
4.1.2 Expressão de IL-2 canina recombinante em <i>E. coli</i>	38
4.1.3 Purificação de IL-2 canina recombinante expressa em <i>E. coli</i>	39

4.1.4	Renaturação de IL-2 canina recombinante expressa em <i>E. coli</i>	40
4.2	PRODUÇÃO DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE EM CÉLULAS DE MAMÍFERO	42
4.2.1	Sumário do procedimento	42
4.2.2	Isolamento de CMSP de cães e obtenção de RNA total	42
4.2.3	Síntese do cDNA de IL-2 por reação de transcrição reversa (RT) seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR)	44
4.2.4	Clonagem do cDNA de IL-2 canina em plasmídeo pcDNA3.1	46
4.2.5	Seleção de clones de <i>E. coli</i> contendo pcDNA3.1-caIL-2	48
4.2.6	Sequenciamento do cDNA de IL-2 canina clonado em pcDNA3.1	49
4.2.7	Expressão de IL-2 canina recombinante em células de mamíferos	49
4.3	ANÁLISE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE	50
4.4	PRODUÇÃO DE IL-12 CANINA RECOMBINANTE	52
4.5	ANIMAIS	52
4.6	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE DE ESTIMULAR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) DE CÃO	53
4.6.1	Obtenção e caracterização de CMSP	53
4.6.2	Efeito proliferativo sobre CMSP homólogas	53
4.6.3	Indução da produção de IFN- γ em CMSP	54
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS	57
5.1	CLONAGEM E EXPRESSÃO DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE BIOLÓGICAMENTE ATIVA EM <i>Escherichia coli</i> E EM CÉLULAS DE MAMÍFERO	57

5.2	ATIVIDADE BIOLÓGICA DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) DE CÃO	64
5.2.1	Composição celular das preparações de CMSP	64
5.2.2	Efeito proliferativo de IL-2 canina recombinante em CMSP	64
5.2.3	Produção de IFN-γ por CMSP estimuladas com IL-2 canina recombinante, associada ou não a IL-12 canina recombinante	69
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	célula apresentadora de antígeno
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
Con-A	concanavalina A
CTP	citosina trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
D.O.	densidade óptica
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
GTP	guanina trifosfato
HBSS	solução salina balanceada de Hanks
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	interferon gama
IL	interleucina
IPTG	0,5, isopropil-tio- β -galactosídeo

LB	Luria Bertani
LPS	lipopolissacarídeo
LV	leishmaniose visceral
LVZ	leishmaniose visceral zoonótica
M-MLV	vírus Moloney da leucemia murina
NK	“natural killer”
rcaIL-2	interleucina 2 canina recombinante
RNA	ácido ribonucleico
RPMI 1640	meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial
RT-PCR	reação de transcrição reversa seguida de reação da polimerase em cadeia
SBF	soro bovino fetal
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SN COS Ø	sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1
SN COS rcaIL-2	sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-caIL-2
SN COS sccaIL-12	sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-sccaIL-12
T _H	T “helper”
TMB	tetrametilbenzidina
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TTP	timidina trifosfato

LISTA DE FIGURAS

Tabela 1. Composição dos tampões usados na renaturação por diálise de IL-2 canina recombinante	41
Figura 1. Produção de IL-2 canina recombinante em <i>E. coli</i> .	58
Figura 2. Atividade biológica de IL-2 canina recombinante produzida em <i>E. coli</i> sobre células CTLL-2.	61
Figura 3. Atividade biológica de IL-2 canina recombinante produzida em COS-7 sobre células CTLL-2.	63
Figura 4. Atividade proliferativa de IL-2 canina recombinante produzida em <i>E. coli</i> sobre CMSP.	66
Figura 5. Atividade proliferativa de IL-2 canina recombinante produzida em COS-7 sobre CMSP.	68
Figura 6. Produção de IFN- γ em sobrenadantes de CMSP estimuladas com IL-2 ou IL-12 caninas recombinantes.	71

Figura 7. Produção de IFN- γ em sobrenadantes de CMSP estimuladas com associações de IL-2 e IL-12 caninas recombinantes.

RESUMO

ATIVACÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES CANINAS POR INTERLEUCINA-2 E INTERLEUCINA-12 RECOMBINANTES HOMÓLOGAS. **ANDRÉA MENDES PEREIRA.** Visando avaliar futuramente o potencial de citocinas na indução de resposta imune celular específica do tipo T_H1 quando associadas a antígeno(s) recombinante(s) de *Leishmania chagasi/infantum* no cão, a combinação de IL-2 e IL-12 caninas recombinantes é analisada no presente trabalho. Aqui, descrevemos a clonagem do DNA complementar (cDNA) e, pela primeira vez, a expressão de IL-2 canina recombinante biologicamente ativa em *Escherichia coli* e por células de mamífero. Para expressão em *E. coli*, utilizou-se a construção pRSET-caIL-2, anteriormente gerada por nosso grupo. Para expressão em células de mamíferos, foi realizada a clonagem do cDNA de IL-2, sintetizado por reação de transcrição reversa seguida de reação da polimerase em cadeia (RT-PCR) a partir do RNA total de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cão estimuladas com concanavalina A (Con-A), no vetor pcDNA3.1, gerando a construção pcDNA3.1-caIL-2. O sucesso da clonagem em ambos os vetores de expressão foi confirmado a partir do sequenciamento de DNA e comparação dos resíduos de nucleotídeos com a seqüência de IL-2 canina previamente descrita por outro grupo de investigadores. A IL-2 canina recombinante (rcaIL-2) foi obtida como proteína de fusão contendo cauda de histidina a partir da transformação de *E. coli* BL21(DE3)pLysS com pRSET-caIL-2, purificada por cromatografia de afinidade e renaturada por diálise. Além disso, a forma nativa de rcaIL-2 foi secretada no sobrenadante de cultura de células COS-7 transfectadas com a construção pcDNA3.1-caIL-2. A atividade proliferativa de rcaIL-2 sobre células CTLL-2 foi demonstrada em concentrações de até 220 pg/mL da citocina purificada a partir da expressão em *E. coli* e até a diluição de 1:256 do sobrenadante de COS-7 contendo rcaIL-2. A proteína biologicamente ativa foi capaz de manter a proliferação de CMSP de cães saudáveis por até 12 dias de cultivo quando as células foram tratadas com 50 ng/mL de IL-2 canina obtida de *E. coli* e por 10 dias com diluições de até 1:200 do sobrenadante de COS-7 contendo a citocina, na ausência de estímulo prévio ou concomitante. A proliferação foi dose-dependente, com ponto máximo ocorrendo no 8º dia de cultivo. A produção de interferon gama (IFN- γ) por CMSP de cães saudáveis estimuladas com sobrenadante de COS-7 contendo IL-2 ou contendo IL-12 não foi significativamente maior que a produção basal. No entanto, um efeito sinérgico sobre a produção *in vitro* de IFN- γ ocorreu quando concentrações subótimas de ambas as citocinas foram associadas. Diante dos resultados obtidos, a construção pcDNA3.1-caIL-2 e ambas as formas de IL-2 canina recombinante obtidas, assim como as condições experimentais aqui descritas, poderão ser utilizadas no futuro para o estudo do potencial de IL-2, associada ou não a IL-12, como modulador da resposta imune *in vitro* e *in vivo* de cães, durante o desenvolvimento de uma vacina ou imunoterapia para leishmaniose visceral canina.

Descritores: Interleucina-2, Imunidade celular, Interferon-gama, Cão.

ABSTRACT

CANINE MONONUCLEAR CELLS ACTIVATION BY HOMOLOGOUS RECOMBINANT INTERLEUKIN-2 AND INTERLEUKIN-12. ANDRÉA MENDES PEREIRA. Aiming to study in the future the role of cytokines in inducing specific T_H1 cellular immune response when associated to *Leishmania chagasi/infantum* recombinant antigen(s) in dogs, the combination of recombinant canine IL-2 and IL-12 is analysed in the present study. Herein, we describe complementary DNA (cDNA) cloning and, for the first time, the expression of biologically active recombinant canine IL-2 in *Escherichia coli* and mammal cells. The construction pRSET-caIL-2, previously generated by our group, was used for *E. coli* expression. For mammalian expression, canine IL-2 cDNA was synthesized by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR), using cDNA from a healthy dog's peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with concanavalin A (Con-A) and cloned into pcDNA3.1, generating the construction pcDNA3.1-caIL-2. Success in canine IL-2 cDNA cloning was accessed in both expression vectors by DNA sequencing and was confirmed by comparing nucleotides residues with canine IL-2 sequence previously described by other investigators. Recombinant canine IL-2 (rcaIL-2) was expressed as His-tag fusion protein after *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformation with pRSET-caIL-2, purified by affinity chromatography and renatured through dialysis. In addition, the native form was secreted in culture supernatants of pcDNA3.1-caIL-2 transfected COS-7 cells. A proliferative activity was demonstrated in CTLL-2 cells when the recombinant protein was diluted at 220 pg/mL of purified cytokine from *E. coli* expression or when COS-7 supernatant was diluted at 1:256. The biologically active protein was able to induce proliferation of PBMC of six healthy dogs until 12 days of culture when cells were treated with 50 ng/mL of *E. coli* expressed-IL-2 or until 10 days when treated with 1:200 COS-7 supernatant dilution containing the cytokine, without previous or concomitant stimulus. The proliferative effect was dose-dependent and maximum at 8th day of culture. Interferon-gamma (IFN- γ) production by PBMC of eight healthy dogs induced by COS-7 IL-2 or IL-12-containing supernatants was not significantly higher than the baseline production. However, the association of suboptimal concentrations of both cytokines induced synergistic effect upon *in vitro* IFN- γ production by PBMC. Based on the presented results, the construction pcDNA3.1-caIL-2 or both recombinant protein forms obtained, as well as the experimental conditions described here, can be used in the future to evaluate the potential role of IL-2, associated or not to canine IL-12, as a modulator of *in vitro* and *in vivo* immune response of dogs during the development of a vaccine or immunotherapy for canine visceral leishmaniasis.

Keywords: Interleukin-2, Cellular immunity, Interferon-gamma, Dog.

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

A utilização da espécie canina como modelo experimental tem sido muito útil ao avanço da pesquisa biomédica. Isso decorre do fato do cão apresentar muitas semelhanças fisiológicas com o ser humano e desenvolver espontaneamente desordens homólogas a entidades patológicas humanas (ILAR, 1994). O cão é também um importante objeto de investigação científica na Saúde Pública, particularmente no estudo de zoonoses em que atua como fonte de infecções para o ser humano e, por isso, torna-se alvo de medidas de controle para tais enfermidades.

Uma das doenças infecto-parasitárias na qual o cão parece desempenhar um papel importante é a leishmaniose visceral zoonótica (LVZ; DEANE & DEANE, 1955b; ASHFORD *et al.*, 1998). A enfermidade é grave, pode ser fatal na maioria dos casos não tratados, e é endêmica em vários países da Bacia Mediterrânea, em países do Oriente Médio e no Brasil. Nestas regiões, a LVZ é causada pelo protozoário *Leishmania chagasi/infantum*, cujo principal reservatório da infecção é o cão. O agente etiológico é transmitido ao ser humano, na maioria das vezes, pela picada de insetos vetores, denominados flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo (DESJEUX, 1996).

Após a inoculação do parasito pela picada do inseto vetor, o protozoário é fagocitado por macrófagos e, na dependência da existência de condições favoráveis, pode multiplicar-se no interior dos fagócitos, bem como disseminar para diversos órgãos, particularmente para aqueles ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como fígado, baço, medula óssea e linfonodos, e assim causar doença (MC ADAM & SHARPE, 2005). Em seres humanos, a doença cursa principalmente com febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia (BEERS & BERKOW, 1999; PEARSON *et al.*, 2000) e, no cão, com lesões cutâneas, perda de peso e

anemia (MARZOCHI *et al.*, 1985; TABOADA & MERCHANT, 1995; CIARAMELLA *et al.*, 1997).

A depender da resposta do hospedeiro, vários desfechos podem ocorrer após a infecção por *L. chagasi/infantum*, tanto no homem como no cão. Estudos prospectivos mostram que o homem pode desenvolver uma infecção assintomática (BADARÓ *et al.*, 1986; CARVALHO *et al.*, 1992; GAMA *et al.*, 2004), e que esta última pode evoluir para a cura espontânea ou para forma sintomática (BADARÓ *et al.*, 1986; CARVALHO *et al.*, 1992; EVANS *et al.*, 1992). Os estudos no cão também sugerem que esse animal pode apresentar qualquer uma das duas formas de infecção (LANOTTE *et al.*, 1979; POZIO *et al.*, 1981; QUINNELL *et al.*, 2001).

A resistência ao estabelecimento da doença ou o controle do progresso da infecção depende provavelmente da resposta imune inata, da resposta imune celular específica adquirida e do desenvolvimento e manutenção de células de memória pelo hospedeiro (KAYE *et al.*, 2004). A resposta imune capaz de controlar a infecção envolve a produção de interferon gama (IFN- γ), ativação de macrófagos e destruição dos parasitos intracelulares, promovida pela ativação do metabolismo do oxigênio e do óxido nítrico (MURRAY *et al.*, 1983).

O tratamento farmacológico que, na maioria das vezes, é eficaz e resulta em cura clínica duradoura na doença humana (COOK *et al.*, 1993), não proporciona os mesmos resultados na doença canina. No cão, a quimioterapia promove, apenas transitoriamente, remissão das manifestações clínicas, ocorrendo, com grande frequência, recaída após a interrupção da administração dos fármacos (MANCIANTI *et al.*, 1988; SLAPPENDEL & TESKE, 1997; MORENO *et al.*, 1999; BANETH & SHAW, 2002). Além disso, o tratamento não elimina a infectividade do cão para o vetor (ALVAR *et al.*, 1994) e pode contribuir para a seleção de cepas resistentes a medicamentos usados na terapia humana (GRAMICCIA *et al.*, 1992).

No Brasil, as medidas de controle para LVZ preconizadas pelo Ministério da Saúde incluem a investigação epidemiológica, o tratamento de casos humanos, o combate ao inseto vetor, a eliminação do principal reservatório, realizada pela identificação e sacrifício de cães naturalmente infectados, e educação em saúde (BRASIL, 2003). Como essas medidas são dispendiosas e trabalhosas, freqüentemente elas não são mantidas pelo período necessário ao alcance da prevenção da infecção, prejudicando o controle da LVZ (COURTENAY *et al.*, 2002).

Uma maneira possivelmente adequada para controlar a infecção e/ou o desenvolvimento da doença, tanto para Saúde Pública quanto para a Medicina Veterinária, seria o uso de uma vacina e/ou um método imunoterápico para leishmaniose visceral (LV) canina capazes de prevenir a transmissão do parasito do cão para o inseto vetor e que, provavelmente, culminaria com a redução da incidência de LV em humanos (DYE, 1996; MORENO & ALVAR, 2002).

Em nosso laboratório, pretende-se avaliar combinações de antígenos recombinantes de *L. chagasi/infantum* e citocinas caninas recombinantes quanto à capacidade de induzir resposta imune celular específica protetora em cães sem exposição prévia ao agente, ou em cães com LV, submetidos ou não a um curso curto de quimioterapia convencional, visando o desenvolvimento de uma vacina ou de um método imunoterápico, respectivamente. Para seleção de antígenos candidatos, nosso grupo de pesquisa produziu uma biblioteca de cDNA e uma biblioteca genômica de *L. chagasi/infantum* e, além disso, clonou em plasmídeos ou recebeu como doação o DNA complementar (cDNA) de várias citocinas caninas a serem analisadas como moduladores da resposta imune (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , GM-CSF e TNF- α). Com essas construções, algumas das citocinas caninas recombinantes foram expressas em *Escherichia coli* (IL-4, IFN- γ e GM-CSF) ou em células de linhagem de mamífero (IL-12, IFN- γ e GM-CSF).

No presente trabalho, a produção de IL-2 canina recombinante biologicamente ativa por *E. coli* e por células de mamífero é descrita, bem como a análise da capacidade dessa citocina de induzir proliferação e, na ausência ou na presença de IL-12 canina recombinante, promover produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico de cães saudáveis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL

2.1.1 Aspectos gerais

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar na Ásia e na África, é definida como uma doença infecto-parasitária sistêmica causada por protozoários intracelulares viscerotrópicos pertencentes ao gênero *Leishmania* (BEERS & BERKOW, 1999).

A infecção natural ocorre pela inoculação de formas infectantes do agente na pele do hospedeiro através da picada de insetos vetores hematófagos, nos quais o parasito se desenvolve após ter sido sugado de outro indivíduo (URQUHART *et al.*, 1990). Tais insetos, denominados flebotomíneos, pertencem à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, no Velho e no Novo Mundo, respectivamente (LAINSON *et al.*, 1977).

A etiologia da LV é atribuída a protozoários flagelados do complexo *Leishmania donovani*, no qual, baseado em características geográficas, epidemiológicas e clínicas, distingue-se três espécies como causadoras da maioria dos casos de LV - *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi* (LAINSON *et al.*, 1987). Mais recentemente, baseados em semelhanças genéticas, alguns autores consideraram as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* essencialmente indistinguíveis (MOMEN *et al.*, 1987; MAURICIO *et al.*, 1999). No presente trabalho, será seguida a denominação *L. chagasi/infantum* para ambas.

A LV causada pela *L. donovani* ocorre principalmente no Sudão, Bangladesh, Índia e Nepal e resulta em uma forma antroponótica da doença, cujo principal reservatório é o homem. Já a LV conseqüente à infecção por *L. chagasi/infantum* acomete principalmente os países da Bacia Mediterrânea, do Oriente Médio e da América do Sul e causa uma forma zoonótica da doença, que tem o cão como principal reservatório da infecção (DESJEUX, 2001).

Em áreas endêmicas de leishmaniose visceral zoonótica (LVZ), a prevalência da infecção canina é elevada, chegando à cerca de 40% de cães sororeagentes (POZIO *et al.*, 1981; EVANS *et al.*, 1990; PARANHOS-SILVA *et al.*, 1996) ou até 80% de cães com DNA parasitário detectável (BERRAHAL *et al.*, 1996; SOLANO-GALLEGGO *et al.*, 2001; QUINNELL *et al.*, 2001; DOS-SANTOS *et al.*, comunicação pessoal), enquanto que uma taxa de incidência de 6,55 casos/cão/ano já foi relatada em uma área endêmica do Sudoeste da Bahia (PARANHOS-SILVA *et al.*, 1998).

No continente americano, 90% dos casos humanos são notificados no Brasil, onde a incidência média da doença é de 3.500 casos por ano distribuídos em quatro regiões geográficas, exceto na Região Sul (BRASIL, 2003). Inicialmente, no Brasil, a LVZ era restrita à área rural ou silvestre, atingindo quase que exclusivamente seres humanos ou cães que entrassem em contato íntimo com a mata (DEANE & DEANE, 1955a). Mais recentemente, novos focos da doença têm surgido em áreas onde florestas são derrubadas para implantação de frentes de trabalho e desenvolvimento de agronegócios (DESJEUZ, 1996; GUERRA *et al.*, 2004). Associado a isso, com a migração da população humana de áreas rurais para áreas urbanas, surtos epidêmicos e focos endêmicos da doença têm ocorrido em áreas periurbanas de várias das grandes cidades brasileiras, notadamente nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2003). Outros fatores relacionados ao surgimento de condições que modificam a suscetibilidade do hospedeiro como,

por exemplo, a coinfeção com vírus da imunodeficiência humana (HIV), também têm favorecido o aumento do número de casos da doença (ALVAR *et al.*, 1997).

No Brasil, as estratégias de controle da LVZ baseiam-se em atividades de educação em saúde, no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, na aplicação de inseticidas para redução da população de flebotomíneos nos prováveis locais de *habitat* do inseto e na eliminação dos reservatórios domésticos identificados através de inquéritos sorológicos (BRASIL, 2003).

Entretanto, a remoção de cães sororeativos das áreas endêmicas não parece contribuir efetivamente para o sucesso do controle da enfermidade (DIETZE *et al.*, 1997; ASHFORD, *et al.* 1998), provavelmente porque a identificação dos reservatórios é baseada em ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos em amostras de sangue eluídos de papel de filtro (BRASIL, 1996 *apud* BRAGA *et al.*, 1998), cuja sensibilidade é baixa quando comparada a outros métodos mais sensíveis (EVANS *et al.*, 1990; ASHFORD *et al.*, 1995; BERRAHAL *et al.*, 1996). Além disso, podem ocorrer longos períodos de latência e boa parte dos cães pode não produzir anticorpos em níveis detectáveis (QUINNELL *et al.*, 2001; COURTENAY *et al.*, 2002). Mais ainda, cães infectados podem continuar transmitindo o parasito para o inseto vetor por cerca de até 80 dias após a coleta da amostra de sangue, quando em média, o sacrifício dos animais com resultado sorológico positivo é realizado (BRAGA *et al.*, 1998).

2.1.2 Aspectos clínicos no ser humano

Após a infecção por *L. chagasi/infantum*, a maioria dos seres humanos desenvolve a forma clínica assintomática, que pode evoluir para cura espontânea (PAMPIGLIONE *et al.*, 1974; BADARÓ *et al.*, 1986; EVANS *et al.*, 1992; GAMA *et al.*, 2004). Alguns indivíduos, no

entanto, desenvolvem a forma clássica da doença, exibindo febre irregular, palidez, perda de peso progressiva, queda de cabelo, distúrbios digestivos (diarréia, anorexia e vômito), episódios de sangramento espontâneo (epistaxis, gengivorragia, enterorragia e hematúria), tosse seca, taquicardia e hipotensão arterial (PEARSON *et al.*, 2000). Ao exame físico, revelam-se intensa esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenomegalia, freqüentemente associadas a edema que tende a encobrir a extensão do emagrecimento (HO *et al.*, 1982). Os achados laboratoriais mais comuns são pancitopenia (anemia, leucopenia e plaquetopenia), hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia policlonal, com inversão da razão albumina/globulina em uma fase mais tardia da doença (PAMPIGLIONE *et al.*, 1974). Infecções secundárias pulmonares e intestinais contribuem para a mortalidade. Na ausência de tratamento, a doença progride para um quadro de hepatoesplenomegalia grave, caquexia e óbito em um a dois anos após o surgimento das primeiras manifestações clínicas (BEERS & BERKOW, 1999).

Com o tratamento quimioterápico, a maioria dos pacientes com a forma clássica da doença desenvolve cura clínica e resposta ao teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (PAMPIGLIONE *et al.*, 1975; BADARÓ *et al.*, 1986). Esses indivíduos são resistentes a reinfeções enquanto não desenvolvem supressão da imunidade mediada por célula, como ocorre em indivíduos infectados por HIV (ALVAR *et al.*, 1997).

2.1.3 Aspectos clínicos no cão

A semelhança do que ocorre no ser humano, no cão a infecção por *L. chagasi/infantum* pode causar desde uma doença crônica sistêmica até formas assintomáticas, que

chegam a representar em torno de 10% da população canina soropositiva de uma área endêmica (LANOTTE *et al.*, 1979; POZIO *et al.*, 1981; PINELLI *et al.*, 1994; FERRER, 1999; RHALEM *et al.*, 1999a).

Cães infectados naturalmente (POZIO *et al.*, 1981; CABRAL *et al.*, 1993; PINELLI *et al.*, 1994; RHALEM *et al.*, 1999a; LEANDRO *et al.*, 2001) ou experimentalmente (ABRANCHES *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1993; SANTOS-GOMES *et al.*, 2003) podem não exibir manifestações clínicas por longos períodos ou podem apresentar lesões cutâneas (úlceras, descamação, pelagem opaca e alopecia), lesões oculares (ceratoconjuntivite e uveíte), linfadenomegalia, apatia e perda de peso. Além disso, os animais podem desenvolver esplenomegalia e, em muitos casos, crescimento anormal e contorcido das unhas (TABOADA & MERCHANT, 1995; SLAPPENDEL & FERRER, 1998).

Entre os achados laboratoriais, relatam-se anemia normocítica normocrômica, leucopenia, plaquetopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (CIARAMELLA *et al.*, 1997; PASA *et al.*, 2005). Nos casos mais severos, depósitos de imunocomplexos, gerados pela acentuada produção de anticorpos e circulação de antígenos parasitários, tendem a gerar poliartrite, vasculite (BRANDONÍSIO *et al.*, 1990; VAMVAKIDIS *et al.*, 2000) e glomerulonefrite (POLI *et al.*, 1991; ZARAGOZA *et al.*, 2003). Esta última parece contribuir para distúrbios da coagulação e plaquetopenia (CIARAMELLA *et al.*, 2005) e, quando associada à falência renal, é a principal *causa mortis*. Alguns animais apresentam dificuldade de deambulação resultante de neuralgias, polimiosites, fissuras nos coxins e periosteítes (TABOADA & MERCHANT, 1995). Na literatura, há relatos de tosse relacionada a pneumonia intersticial (TRYPHONAS *et al.*, 1977).

Diferentemente do que ocorre após o tratamento da doença humana, no cão a administração de drogas antimoniais, em combinação ou não com alopurinol ou anfotericina B, não é capaz de promover cura clínica persistente e eliminar a infectividade do cão para o vetor (MANCIANTI *et al.*, 1988; OLIVA *et al.*, 1995; SLAPPENDEL & TESKE, 1997; BANETH & SHAW, 2002). Após o tratamento, os cães chegam a apresentar redução sem eliminação completa do parasitismo, acompanhada de remissão clínica. Porém, esta é seguida de recaída entre cinco meses (ALVAR *et al.*, 1994; MORENO *et al.*, 1999; GUARGA *et al.*, 2002) a seis anos após o final do tratamento (GRAMICCIA *et al.*, 1992). Alguns estudos apontam a imunossupressão induzida em cães infectados com *L. chagasi/infantum* como determinante do fracasso da quimioterapia no controle definitivo da progressão da doença (OLIVA *et al.*, 1995; MORENO *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999a).

2.2 A RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL

2.2.1 Aspectos gerais da imunidade à *Leishmania*

Nas doenças causadas por patógenos intracelulares, a resistência adquirida contra a infecção depende do desenvolvimento de imunidade específica mediada por células do tipo T “helper” 1 (T_H1) (ABBAS & LICHTMAN, 2003). O estabelecimento desse tipo de resposta depende, dentre outros fatores, do tipo de citocinas expressas na fase inicial da infecção, quando uma resposta T_H1 ou T_H2 pode ser induzida durante a exposição do hospedeiro a moléculas do microorganismo, promovendo expansão clonal de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, na presença de interleucina (IL)-12 ou IL-4, respectivamente (TRINCHIERI, 2003).

Na LV, parte do conhecimento obtido sobre o papel da resposta imune celular na determinação do curso da infecção por *L. chagasi/infantum* tem sido gerado através de estudos em modelos experimentais murinos. No camundongo, a LV experimental não reproduz o curso fatal da infecção como pode ocorrer em indivíduos suscetíveis das espécies humana e canina. Contudo, os padrões de resistência ou suscetibilidade exibidos por diferentes linhagens murinas isogênicas e mutantes têm permitido a análise dos mecanismos imunológicos envolvidos na estimulação e manutenção de funções efetoras contra o parasito (KAYE *et al.*, 2004).

Após a infecção por *L. chagasi/infantum*, o agente é fagocitado pelo macrófago, dentro do qual, na dependência da existência de condições favoráveis, ele pode se multiplicar no interior do fagolisossoma e disseminar para diversos órgãos (MC ADAM & SHARPE, 2005). O desfecho dessa exposição ao parasito depende, entre outros fatores, da influência das características genéticas do hospedeiro sobre o desenvolvimento de imunidade, tanto em uma fase bastante inicial da infecção, como durante o estabelecimento de resposta imune adquirida específica (KAYE *et al.*, 2004).

Mecanismos de resistência inata, capazes de interferir na taxa de multiplicação do parasito no macrófago durante a fase inicial da infecção (BLACKWELL, 1983a; CROCKER *et al.*, 1984), já foram relacionados a expressão de genes envolvidos na regulação do pH interno do fagolisossoma (GOSWAMI *et al.*, 2001). O silenciamento do gene murino *Slc11a1* (VIDAL *et al.*, 1995), que codifica uma molécula transportadora de prótons na membrana do fagolisossoma, assim como polimorfismos no mesmo gene humano e canino (*Nramp1*) já foram relacionados a suscetibilidade à LV (ALTET *et al.*, 2002; MOHAMED *et al.*, 2004).

Mesmo que inicialmente o hospedeiro se beneficie da resistência inata para controlar a infecção, a resposta imune adquirida é que parece determinar o grau de eficácia deste controle (LECLERCQ *et al.*, 1996). O fenótipo de resistência à infecção exibido pela maioria das

linhagens murinas é altamente dependente do haplótipo do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (BLACKWELL, 1983b) e pode ser reconstituído em camundongos mutantes suscetíveis à infecção a partir da transferência de células CD4⁺ e CD8⁺ originadas de camundongos resistentes desafiados com o parasito (STERN *et al.*, 1988; KAYE *et al.*, 1992). No cão, relatos de variações de suscetibilidade a infecções experimentais entre animais mestiços (PINELLI *et al.*, 1994), assim como de resistência à progressão da doença em determinadas raças (SOLLANO-GALLEGO *et al.*, 2000), sugerem que fatores genéticos podem influenciar a capacidade do cão de responder à infecção. De fato, a associação entre o alelo DLA-DRB1 e a suscetibilidade ao agente foi demonstrada em cães mestiços de uma área endêmica do Brasil (QUINNELL *et al.*, 2003). Entretanto, no ser humano nenhuma associação entre haplótipos do MHC humano (HLA) e suscetibilidade à progressão da LV foi identificada até o momento (MEDDEB-GARNAOUI *et al.*, 2001; PEACOCK *et al.*, 2002).

As principais células que participam do controle do progresso da infecção por *L. chagasi/infantum* são o macrófago, o linfócito T CD4⁺, o linfócito T CD8⁺ e a célula “natural killer” (NK). O macrófago exerce um papel central, não só por ser a célula que hospeda o parasito, mas também por ser responsável pelo controle de sua multiplicação e por sua destruição. Nele, a multiplicação do agente é controlada pela ativação de mecanismos microbicidas, envolvendo a produção de metabólitos do óxido nítrico e do oxigênio (NATHAN *et al.*, 1983; MURRAY & CARTELLI, 1983; MURRAY & NATHAN, 1999).

O estado de ativação do macrófago depende da influência de substâncias que podem ser secretadas pelos dois subtipos de linfócitos T_H ativados após a exposição ao agente. Quando, em consequência à infecção, ocorre estimulação de linfócitos T CD4⁺ específicos do tipo T_H1, estas células produzem predominantemente interferon-gama (IFN- γ) e este promove ativação do macrófago e destruição dos parasitos (LIEW *et al.*, 1989; MURRAY & NATHAN, 1999). Esse

tipo de resposta é exibido por seres humanos e cães que desenvolvem a forma assintomática da LV, bem como por aqueles que apresentam remissão clínica após serem tratados da forma clássica da doença (HALDAR *et al.*, 1983; CABRAL *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 1992; D'OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 1997; MORENO *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999a; RHALEM *et al.*, 1999b). Esses indivíduos apresentam resposta linfoproliferativa *in vitro* à estimulação com antígenos parasitários (CARVALHO *et al.*, 1981; HALDAR *et al.*, 1983; MELLER-MELLOUL *et al.*, 1991), com produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (CARVALHO *et al.*, 1985; BACELLAR *et al.*, 1991; CILLARI *et al.*, 1991; HOLADAY *et al.*, 1993; PINELLI *et al.*, 1994; GHALIB *et al.*, 1995; PINELLI *et al.*, 1995).

Por outro lado, se durante a infecção ocorrer estimulação de linfócitos T CD4⁺ específicos do tipo T_H2, e produção de IL-4 e de IL-10 por essas células, sucede-se a inativação de macrófagos e, conseqüentemente, o favorecimento da multiplicação e distribuição generalizada do parasito (HEINZEL *et al.*, 1989; SADICK *et al.*, 1990). Tanto no ser humano como no cão, esse tipo de resposta está associada a forma sintomática da infecção e é caracterizada por uma resposta celular ineficiente (CARVALHO *et al.*, 1981; HALDAR *et al.*, 1983, SACKS *et al.*, 1987, MELLER-MELLOUL *et al.*, 1991; CABRAL *et al.*, 1993; PINELLI *et al.*, 1994; PINELLI *et al.*, 1995), com predomínio da produção de IL-4 e de IL-10, em detrimento da produção de IFN- γ e IL-2, na presença de antígenos parasitários (CARVALHO *et al.*, 1985; GHALIB *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 1994; SUNDAR *et al.*, 1997; PINELLI *et al.*, 1999b; HOLADAY, 2000; SANTOS-GOMES *et al.*, 2002; da COSTA-PINHEIRO *et al.*, 2005), associada à intensa estimulação policlonal de linfócitos B com produção de grandes quantidades de anticorpos específicos e inespecíficos para o parasito (BADARÓ *et al.*, 1986; GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1984; BRANDONISIO *et al.*, 1990; LEANDRO *et al.*, 2001). Além

dos anticorpos, fatores séricos imunossupressores contribuem para estimulação da produção de IL-10 por macrófagos em detrimento da produção de IL-12 (BARRAL *et al.*, 1986; BARRAL-NETO *et al.*, 1991; BRANDONÍSIO *et al.*, 1996; MILES *et al.*, 2005).

Enquanto que linfócitos T_H1 $CD4^+$ são essenciais para o desenvolvimento de imunidade contra o parasito, linfócitos T $CD8^+$ podem contribuir para o predomínio da resposta T_H1 (KHARAZMI *et al.*, 1999; UZZONA *et al.*, 2004), para destruição do parasito por mecanismos citotóxicos (SMITH *et al.*, 1991; PINELLI *et al.*, 1995) e para a proteção contra reinfecções (MULLER, 1992; GURUNATHAN *et al.*, 2000; MURRAY, 2005).

No cão doente, a incapacidade de linfócitos T de responder a antígenos do parasito em uma fase precoce da infecção (PINELLI *et al.*, 1994; DE LUNA *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999a; SANTOS-GOMES *et al.*, 2003) pode estar associada a uma acentuada redução da população de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ (MORENO *et al.*, 1999) e a uma inibição da expressão de moléculas coestimulatórias B7 por células apresentadoras de antígenos (PINELLI *et al.*, 1999a).

Células NK também podem contribuir para ativação macrofágica através da produção de IFN- γ e interação com outras células efectoras (HARMS *et al.*, 1991; SHARTON & SCOTT, 1993; LASKAY *et al.*, 1993; NYLEN *et al.*, 2003; BAJENOFF *et al.*, 2006). A ativação de células NK, que parece decorrer da estimulação por IL-12 durante a fase inicial da infecção ou da exposição direta aos antígenos parasitários (NYLEN *et al.*, 2003; BAJENOFF *et al.*, 2006), contribui para redução da carga parasitária no tecido do hospedeiro (MATTNER *et al.*, 2006).

A magnitude da resposta inicial e a resistência adquirida durante a infecção primária parecem determinar a resistência à reinfecções. Após um segundo desafio com o antígeno parasitário (ISMAIL *et al.*, 1999) ou durante a reinfecção (ZAPH *et al.*, 2004), linfócitos T $CD4^+$ efetores, eficientemente estimulados durante o curso da infecção primária, são capazes de migrar

para o sítio de inoculação, ao mesmo tempo em que uma população de células de memória, induzida precocemente durante o primeiro contato com o parasito, é capaz de proliferar e migrar do linfonodo para o local de nova penetração do agente (ZAPH *et al.*, 2004). No camundongo, foi demonstrado que a integridade da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (MURRAY *et al.*, 1989) assim como, o estabelecimento desta população de células de memória (MURRAY, 2005), é essencial para a prevenção da reativação da infecção após quimioterapia com compostos antimonialis. Na LV humana, a população de linfócitos T de memória, reduzida durante a fase ativa da doença, é reestabelecida após terapia convencional (CILLARI *et al.*, 1991). Todavia, ainda não se conhece os mecanismos que promovem a manutenção e expansão dessas células de memória durante a infecção (SCOTT, 2005).

2.2.2 A interleucina 2 e a modulação da resposta imune na leishmaniose visceral

A IL-2 foi inicialmente descrita como um fator de crescimento presente no sobrenadante de cultura de linfócitos estimulados com fitohemaglutinina e capaz de manter a proliferação de linfócitos normais derivados de medula óssea humana (MORGAN *et al.*, 1976). Essa citocina é uma glicoproteína monomérica com peso molecular em torno de 15 kDa (TANIGUCHI *et al.*, 1983), secretada naturalmente por linfócitos ativados por estímulos mitogênicos e antigênicos e que é capaz de promover proliferação de linfócitos T (SMITH, 1980) e citotoxicidade mediada por células NK (HENNEY *et al.*, 1981).

A IL-2 é secretada principalmente por linfócitos T, sendo as células T_H1 as que mais produzem IL-2 após estímulo antigênico. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ secretam IL-2 após estimulação específica durante a exposição ao antígeno a partir da interação do complexo

TCR/CD3 e de CD28 com MHC-antígeno e moléculas B-7 na célula apresentadora de antígeno (APC), respectivamente (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Além disso, a estimulação policlonal por anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, também promove a produção de IL-2 por linfócitos T CD4⁺ (GAFFEN & LIU, 2004). Algumas APC, como linfócitos B (WALKER *et al.*, 1988) e células dendríticas (GRANUCCI *et al.*, 2001) também são capazes de produzir pequenas quantidades de IL-2 e, assim, contribuir para a ativação do linfócito T durante a exposição ao antígeno.

A IL-2 atua como um fator de expansão para populações de linfócitos T ativados e participa na determinação da magnitude e da duração da resposta imune primária e de memória. Durante o estabelecimento da resposta imune contra um determinado patógeno, a expansão seletiva de populações de linfócitos T depende da produção e secreção de IL-2 e de seu receptor de alta afinidade na superfície da célula ativada (ABBAS & LICHTMAN, 2003). A interação de IL-2 com seu receptor ativa vias de sinalização intracelular dependentes de fosfolipase C que, através da regulação de fatores de transcrição (NFAT, NFκB e AP-1) (JAIN *et al.*, 1995), promovem a expressão de genes relacionados à regulação do ciclo celular (MIYAZAKI *et al.*, 1995) e à expressão de IL-2 e de seu próprio receptor (BETTENS *et al.*, 1984; TAYLOR *et al.*, 1986), resultando na proliferação de clones de linfócitos ativados.

A IL-2 também participa da regulação da resposta imune e do controle do estabelecimento de autoimunidade. Quando ocorre persistência do estímulo antigênico, a IL-2 promove a expressão de Fas-L pelo linfócito que, ao interagir com seu ligante (Fas), induz a morte programada de populações de linfócitos T ativados, contribuindo para a homeostase na resposta imune (VAN PARIJS & ABBAS, 1998; REFAELI *et al.*, 1998). Um outro efeito regulatório de IL-2 está relacionado à sua participação no desenvolvimento e ativação de células

tímicas regulatórias CD4⁺ CD25⁺, prevenindo o estabelecimento de autoimunidade (MALEK *et al.*, 2000; MALEK *et al.*, 2002).

O receptor de IL-2 é constituído de três cadeias polipeptídicas e denominadas α (p55 ou CD25), β (p75 ou CD122) e γ (p65 ou CD132). As células linfóides podem expressar apenas a cadeia α – que compõe o receptor de baixa afinidade, as cadeias α e β – que compõem o receptor de afinidade intermediária, ou as três cadeias – que compõem o receptor de alta afinidade, conferindo, através dessas diferenças de afinidade, um mecanismo de controle da magnitude da expansão de populações ativadas (RICKERT *et al.*, 2005; STAUBER *et al.*, 2006). Após a exposição a fontes exógenas de IL-2, uma parte da população de linfócitos circulantes é capaz de proliferar, mesmo na ausência de outros estímulos. Essas células expressam constitutivamente a cadeia β do receptor de IL-2 e, na presença da citocina passam a expressar também a cadeia α do receptor, que aumenta a afinidade deste pela citocina (BETTENS *et al.*, 1984; TAYLOR *et al.*, 1986). A análise fenotípica das células que respondem à IL-2, na ausência de outro estímulo aparente, revela que a sua maioria é representada por uma grande parte de células NK (TRINCHIERI *et al.*, 1984; WILLIAMS *et al.*, 1985; CALIGIURI *et al.*, 1990) e por uma menor fração de células T (TRINCHIERI *et al.*, 1984; LAKHANPAL *et al.*, 1987).

Em células NK, a IL-2 também é capaz de induzir a expressão de IFN- γ , mesmo na ausência de outros estímulos (WEIGENT *et al.*, 1983; TRINCHIERI *et al.*, 1984), e mediar a atividade citotóxica (HENNEY *et al.*, 1981; DEVOS *et al.*, 1984; HELFAND *et al.*, 1992) contra células neoplásicas e agentes infecciosos (KAUFMANN *et al.*, 1987; MANNA *et al.*, 1993).

Quando administrada *in vivo*, a IL-2 promove proliferação, principalmente no fígado, baço, rins, linfonodos e cérebro, de uma população de células com características de linfócitos citotóxicos (ETTINGHAUSEN *et al.*, 1985; ORTALDO *et al.*, 2005). Além disso, logo após a

administração de IL-2, observa-se aumento transitório da concentração sérica de IFN- γ secretado por células NK (THORNTON *et al.*, 2001; ORTALDO *et al.*, 2005).

Camundongos atímicos infectados por *L. donovani* e não responsivos à quimioterapia com antimoniais, restabelecem a resposta celular após a administração de IL-2 ou após a reposição de linfócitos T, sugerindo que fontes exógenas de IL-2 revertem a refratariedade ao tratamento provocada pela ausência de células efectoras específicas (MURRAY *et al.*, 1989). Em camundongos BALB/c, o uso de IL-2 promove a formação de granulomas bem desenvolvidos, capazes de isolar o parasito, e a expressão de IFN- γ no tecido hepático (MURRAY *et al.*, 1993).

Em pacientes humanos que exibem a forma clássica da LV, a adição de IL-2 e IFN- γ restabelece a resposta celular específica *in vitro* contra antígenos de *L. chagasi/infantum* e a produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (CARVALHO *et al.*, 1994). Além disso, a imunossupressão induzida por soro de pacientes com LV, contendo altos níveis séricos de receptor solúvel de IL-2, sobre células de indivíduos assintomáticos ou normais é restaurada pela adição de IL-2 (BARRAL-NETO *et al.*, 1991). No calazar indiano, a atividade citotóxica *in vitro* de células NK de pacientes doentes é restabelecida aos níveis normais a partir do tratamento prévio de CMSP com IL-2 (MANNA *et al.*, 1993).

No cão, já foi descrito o aumento da produção de IL-2 por CMSP de animais que não exibem manifestações clínicas após a infecção por *L. chagasi/infantum* (PINELLI *et al.*, 1994). Entretanto, até o momento, não foi relatada a capacidade de IL-2 de instaurar a resposta imune protetora na LV canina.

2.2.3 A interleucina 12 e a modulação da resposta imune na leishmaniose visceral

A IL-12 foi inicialmente descrita como um fator produzido por linfócitos B humanos transformados com vírus Epstein-Barr, capaz de ativar células NK, de induzir proliferação e produção de IFN- γ por linfócitos T (KOBAYASHI *et al.*, 1989). Trata-se de uma proteína heterodimérica, composta das subunidades p35 e p40 unidas por pontes dissulfídicas, produzida por monócitos, macrófagos, neutrófilos, microglia, células dendríticas e, em menor escala, por linfócitos B apresentadores de antígeno, mediante estímulos inflamatórios gerados por bactérias, parasitos intracelulares e fungos (TRINCHIERI, 2003).

As propriedades biológicas de IL-12 mais bem caracterizadas são aquelas sobre os linfócitos. Embora não promova proliferação de células não estimuladas, a IL-12 é capaz de aumentar a atividade proliferativa de linfócitos T e células NK quando estas também são expostas à IL-2, a lectinas mitogênicas, a antígenos e a anticorpos anti-CD3 (KOBAYASHI *et al.*, 1989; BERTAGNOLLI *et al.*, 1992).

Em linfócitos T e células NK, a IL-12 induz a produção de IFN- γ , o qual aumenta a atividade microbicida e a expressão de MHC classe I e MHC classe II em células fagocíticas, deflagrando a resposta imune inata e regulando a diferenciação e expansão de populações de linfócitos T_{H1} CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicos (WATFORD *et al.*, 2003).

O IFN- γ também é capaz de aumentar a produção de IL-12, gerando um mecanismo de regulação positiva na resposta imune T_{H1} (TRINCHIERI, 2003). Por outro lado, a produção de IL-12 é inibida especialmente por IL-10, através do bloqueio da transcrição de p35 e p40 (D'ANDREA *et al.*, 1993; ASTE-AMEZAGA *et al.*, 1998), e por TGF- β , através da instabilização da molécula de RNAm de p40 (DU & SRIRAM, 1998).

Devido às suas propriedades biológicas e por ser capaz de reverter respostas imunes em curso para o tipo T_{H1} (HSIEH *et al.*, 1993), a utilização de IL-12 como adjuvante em imunoterapias vem sendo investigada, especialmente em enfermidades onde o estabelecimento de resposta T_{H2} é prejudicial ao indivíduo.

Em modelos murinos suscetíveis ao desenvolvimento de LV, a administração de IL-12 murina recombinante durante a primeira semana de infecção de camundongos BALB/c promove o controle da multiplicação do parasito, aumento da produção de IFN- γ e redução da produção de IL-4 por esplenócitos estimulados *ex vivo* por antígenos parasitários (HEINZEL *et al.*, 1993). A neutralização de IL-12 endógena durante as quatro semanas iniciais de infecção por *L. donovani* em camundongos impede o controle da multiplicação do parasito com aumento da carga parasitária, redução da produção de IFN- γ e da formação de granulomas. Estes dados sugerem que, em uma fase inicial da interação do parasito com o hospedeiro, a IL-12 participa no desenvolvimento de resposta imune adquirida (MURRAY *et al.*, 1997).

Em seres humanos, CMSP de pacientes com calazar indiano, cultivadas com lisado de *L. donovani*, exibem resposta proliferativa específica e produção de IFN- γ quando na presença de IL-12 humana recombinante (GHALIB *et al.*, 1995). Resultados semelhantes foram observados em CMSP de pacientes com LVZ, nas quais a IL-12 é capaz de induzir a produção de IFN- γ e a resposta proliferativa e citotóxica após estimulação na presença de antígenos de *L. chagasi/infantum* (BACELLAR *et al.*, 1996).

Recentemente, nosso grupo demonstrou que CMSP obtidas de cães infectados naturalmente com *L. chagasi/infantum* e exibindo manifestações clínicas de LV canina, expressam maiores quantidades de RNAm de IFN- γ quando cultivadas na presença de IL-12 canina recombinante de cadeia única, mesmo na ausência de estímulo antigênico (DOS SANTOS *et al.*, 2004). Resultados semelhantes foram relatados por outro grupo de investigadores. A

resposta proliferativa específica e produção de IFN- γ por CMSP de cães sintomáticos naturalmente ou experimentalmente infectados por *L. chagasi/infantum* é restaurada ou aumentada, respectivamente, na presença de IL-12 canina recombinante e abolida na presença de IL-10 canina recombinante (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2005).

2.2.4 O sinergismo de IL-12 e IL-2 na resposta imune

A demonstração de que IL-2 é capaz de induzir a produção de IFN- γ e citotoxicidade por células NK circulantes humanas (TRINCHIERI *et al.*, 1984) e de que este efeito, também promovido por IL-12, é aumentado sinergicamente quando as duas citocinas são utilizadas simultaneamente (KOBAYASHI *et al.*, 1989; CHAN *et al.*, 1991), vêm suscitando o interesse sobre o potencial desta combinação na modulação da resposta imune contra patógenos intracelulares.

Inicialmente, foi descrito que este efeito sinérgico ocorre através de mecanismos pós-transcricionais que acentuam a estabilidade do RNAm de IFN- γ e aumentam sua meia-vida (CHAN *et al.*, 1992). Mais tarde, este aumento na estabilidade do RNAm foi atribuído também a ativação da proteína cinase C citoplasmática (YE *et al.*, 1995).

Além de favorecer a produção de IFN- γ por células NK, as duas citocinas aumentam a atividade lítica de células citotóxicas. Doses sub-ótimas de IL-2 combinadas com IL-12 levam a um aumento de atividade lítica duas vezes superior à adição dos efeitos individuais de cada citocina. Foi demonstrado que este aumento de citotoxicidade está relacionado a maior expressão de granzimas e perforinas, também aumentadas de modo sinérgico por IL-2 associada a IL-12 (DE BLAKER-HOHE *et al.*, 1995). Essas propriedades sinérgicas de IL-2 e IL-12 permitem a

utilização de doses sub-ótimas de ambas, reduzindo os efeitos tóxicos promovidos por maiores doses de cada uma quando utilizadas isoladamente (KAUFMAN *et al.*, 2002).

Um efeito sinérgico e benéfico da associação de IL-2 e IL-12 sobre a resposta imune já foi descrito na hanseníase, onde assim como na LV, a suscetibilidade à multiplicação do agente infeccioso e à disseminação das lesões também está associada à ausência de resposta proliferativa *in vitro* contra antígenos específicos. Em pacientes suscetíveis, a associação de IL-2 e IL-12 humanas recombinantes foi capaz de promover um acentuado efeito sinérgico sobre a resposta celular e produção de IFN- γ específica *in vitro*, capaz de aumentá-los até alcançar a intensidade de resposta exibida por CMSP de pacientes resistentes (de JONG *et al.*, 1997).

Esses dados sugerem que IL-2 e IL-12 agem sinergicamente para restabelecer respostas T_H1 antígeno-específicas e que esta propriedade pode ser aplicada em estratégias imunoterápicas contra leishmaniose visceral zoonótica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir IL-2 canina recombinante (rcaIL-2) e avaliar sua atividade funcional em CMSP de cães saudáveis, associada ou não a IL-12 canina recombinante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar rcaIL-2 biologicamente ativa produzida por *E. coli*.
- Clonar o cDNA e produzir rcaIL-2 biologicamente ativa em células de mamíferos.
- Analisar a capacidade de rcaIL-2 de induzir proliferação em células mononucleares do sangue periférico homólogas.
- Analisar a capacidade de rcaIL-2 de induzir IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico homólogas, associada ou não a IL-12 canina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE EM *Escherichia coli*

4.1.1 Obtenção e seqüenciamento da construção codificando o cDNA de IL-2 canina

Para produção de IL-2 canina em *E. coli*, foi utilizada uma construção previamente produzida em nosso laboratório, pRSET-caIL-2 (RODRIGUES *et al.*, comunicação pessoal). Para elaboração dessa construção, a seqüência de cDNA de IL-2 desprovida da seqüência líder, foi inserida no vetor pRSET-B após amplificação por PCR usando como molde a construção pcRII-caIL-2 (DUNHAM *et al.*, 1995), previamente doada ao nosso grupo pelo Dr. Yung-Fu Chang, da Universidade de Cornell (Ithaca, NY, EUA).

No presente estudo, uma amostra de pRSET-caIL-2 foi submetida a reação de seqüenciamento, realizada através de colaboração com Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ, Recife, PE). Os produtos da reação foram fracionados em sequenciador ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e analisados através do programa SeqAnalysis, versão 5.1 (Applied Biosystems).

4.1.2 Expressão de IL-2 canina recombinante em *E. coli*

A expressão de IL-2 canina foi realizada em *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) transformada com a construção pRSET-caIL-2, seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, uma colônia da bactéria transformada com pRSET-caIL-2 foi cultivada em 50 mL de meio Luria Bertani (LB caldo), preparado com 1% p/v de triptona (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia), 0,5% p/v de extrato de fungo (Vetec Química, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e 1% p/v de NaCl com 50 µg/mL de ampicilina e 35 µg/mL de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) a 37°C e 250 rpm por 16 h, para obtenção de um inóculo que, em seguida, foi semeado em 950 mL de meio LB caldo e cultivado a 37°C e 250 rpm em incubadora orbital (Orbit Environ Shaker; Lab-Line, Seattle, WA, EUA). O crescimento bacteriano foi acompanhado a cada 60 min pela medida da densidade óptica (D.O.) a 600 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 2000; Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra). Quando o valor da D.O. atingiu 0,5, isopropil-tio-β-galactosídeo (IPTG; Invitrogen Corporation) foi acrescentado ao meio de cultura na concentração final de 1 mM. Amostras de 1 mL de cultura foram coletadas em microtubos, antes e 5 h após a indução, para posterior análise da expressão por SDS-PAGE a 15% (LAEMMLI, 1970). Após 5 h de indução, o volume restante da cultura foi centrifugado a 8.000 g e a 4°C durante 15 min, e o sedimento bacteriano obtido foi pesado e armazenado a -20°C.

Posteriormente, o sedimento bacteriano pesando 1,8 g foi ressuspensão em 15 mL de solução aquosa de 50 mM de Tris.HCl – pH 7,6, 1% v/v de Triton X-100 e 1 mg/mL de lisozima. A suspensão foi homogeneizada e mantida sobre gelo durante 30 min. Em seguida, o material foi submetido a sonicação com quatro pulsos constantes de 300 W por 30 s, com 10 s de intervalo entre cada dois pulsos consecutivos (Ultrasonic Processor; PGC Scientifics, Frederick, MD,

EUA). Para sedimentação de restos celulares, a suspensão contendo bactérias lisadas foi centrifugada a 4.000 g e 4°C por 20 min, e o sobrenadante, contendo corpúsculos de inclusão (SCHOEMAKER *et al.*, 1985), foi centrifugado a 17.000 g e a 4°C por 15 min. O sedimento obtido foi homogeneizado em 15 mL de solução aquosa de 50 mM de Tris.HCl – pH 7,6; 1 mM de EDTA e 100 mM de NaCl e depois lavado em 15 mL de solução aquosa de 10 mM de EDTA e 0,5% de Triton X-100. O sedimento final, enriquecido com IL-2 canina recombinante (rcaIL-2) na forma insolúvel, foi lavado duas vezes em 50 mM de Na₂HPO₄ e 300 mM de NaCl - pH 8,0 e, em seguida, solubilizado em 15 mL de 20 mM de Na₂HPO₄, 500 mM de NaCl, 10 mM imidazol e 8 M de uréia - pH 7,4. Através da análise da amostra por SDS-PAGE, foi estimada a presença de aproximadamente 5 mg de rcaIL-2 nos 15 mL da preparação de proteínas solubilizadas.

4.1.3 Purificação de IL-2 canina recombinante expressa em *E. coli*

Como a construção pRSET-calL-2 promove a expressão da proteína recombinante com um segmento de seis moléculas de histidina na extremidade amina da cadeia polipeptídica, a purificação de rcaIL-2 a partir do lisado de *E. coli* foi baseada em um método de cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna cromatográfica elaborada com matriz de partículas de agarose ligada a íons de níquel. Proteínas exibindo uma seqüência de histidinas, que possuem núcleo imidazólico, se ligam ao níquel e podem ser deslocadas da matriz através do tratamento com imidazol.

Para a purificação da citocina, uma coluna cromatográfica foi preparada em um suporte de borossilicato de 1 cm de diâmetro por 20 cm de comprimento (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) e com capacidade para 16 mL. Neste, foram colocados 2 mL de resina (Sephacel Chelating Fast Flow; Amersham Biosciences, Uppsalla, Suécia), preparada conforme

instruções do fabricante. Resumidamente, depois de colocada na coluna, a resina foi lavada com 10 mL de H₂O deionizada autoclavada, carregada com íons de níquel através da passagem de 1,5 mL de solução aquosa de NiSO₄ a 0,1 M e, em seguida, equilibrada com 2 mL de tampão de ligação (20 mM de Na₂HPO₄; 500 mM de NaCl; 10 mM de imidazol e 8 M de uréia – pH 7,4).

Um volume de 7,5 mL da solução de proteínas solubilizadas, descrita na seção anterior, foi aplicado à coluna e o efluente foi coletado e armazenado a 4°C. A resina foi lavada com 50 mL de tampão de lavagem (20 mM de Na₂HPO₄; 500 mM de NaCl; 50 mM de imidazol e 8 M de uréia – pH 7,4) e, em seguida, eluída com cerca de 20 mL de tampão de eluição (20 mM de Na₂HPO₄; 500 mM de NaCl; 250 mM de imidazol e 8 M de uréia – pH 7,4). Frações com volume de cerca de 4 mL foram coletadas para posterior análise por SDS-PAGE. Depois disso, os outros 7,5 mL de solução de proteínas foram aplicados sobre a resina e o processo foi repetido. Finalmente, os efluentes das duas passagens das proteínas solubilizadas foram misturados e passados na coluna, que foi lavada e eluída conforme descrito previamente. As três primeiras frações eluídas de cada um dos três ciclos de passagem pela coluna foram misturadas após a análise por SDS-PAGE indicar que mais de 90% das proteínas dessas frações correspondiam a rcaIL-2, gerando um volume de aproximadamente 36 mL.

4.1.4 Renaturação de IL-2 canina recombinante produzida em *E. coli*

Um volume de 8 mL dos 36 mL da mistura das frações cromatográficas contendo a citocina, foi submetido a um processo de diálise semelhante ao descrito por Guisez e cols. (1993). Resumidamente, 8 mL contendo rcaIL-2 purificada foram misturados a 22 mL de tampão de eluição a fim de ajustar a concentração protéica para aproximadamente 50 µg/mL. Os 30 mL

resultantes foram transferidos para um saco de diálise com membrana de 12.400 kDa de porosidade (Sigma-Aldrich) e submetidos a um banho, sob agitação leve, a 4°C, por sete dias consecutivos, usando os tampões discriminados na Tabela 1.

Após o último banho, o conteúdo do saco de diálise foi centrifugado a 30.000 g e a 4°C, durante 30 min, para remoção de proteínas precipitadas, e concentrado, através de membrana YM 10.000 (Diaflo, Beverly, MA, Ireland) em ultrafiltrador (Amicon Incorporation, Beverly, MA, EUA), até atingir um volume de 15 mL. A solução de rcaIL-2 renaturada foi filtrada através de membrana de 0,22 µm para esterilização e a concentração protéica foi determinada por microensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Depois disso, albumina sérica bovina (BSA) foi acrescentada de modo a alcançar a concentração final de 0,1% (p/v) e alíquotas de 600 µL foram distribuídas em 20 microtubos estéreis, congeladas e armazenadas a -70°C até o uso. Uma alíquota foi usada para determinação da concentração de endotoxina, usando o 'kit' Quantitative Chromogenic LAL (Cambrex, New Jersey, NJ, EUA).

Tabela 1. Composição dos tampões usados na renaturação por diálise de IL-2 canina recombinante

Dia	Tampão fosfato - pH 7.4 (M)	NaCl (M)	Uréia (M)	DTT (mM)	Volume do banho (mL)
1°	0,01	0,15	8	5	150
2°	0,01	0,15	6	2,5	150
3°	0,01	0,15	4	1,5	150
4°	0,01	0,15	2	1	150
5°	0,01	0,15	-	1	150
6°	0,01	0,15			150
7°	0,01	0,15			500

4.2 PRODUÇÃO DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE EM CÉLULAS DE MAMÍFERO

4.2.1 Sumário do procedimento

Para expressão de IL-2 canina em células de mamífero, o cDNA que codifica a proteína foi clonado conforme técnicas convencionais de biologia molecular (SAMBROOCK *et al.*, 2000). O DNA complementar (cDNA) de IL-2 foi sintetizado por reação de transcrição reversa (RT) do RNA total de células mononucleares de sangue periférico de cão (CMSP) estimuladas com concanavalina-A e amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo seqüências adicionais para acréscimo de sítios de restrição. O fragmento de DNA gerado foi digerido por duas endonucleases restritivas e submetido à ligação ao plasmídeo pcDNA3.1/myc-His A (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA), previamente digerido pelas mesmas duas enzimas. A construção obtida foi usada para transformação de *E. coli* e o sucesso da clonagem foi analisado através do sequenciamento do inserto no plasmídeo. A construção foi usada para transfecção de células de linhagens de mamífero e produção de rcaIL-2 secretada no sobrenadante de cultura.

4.2.2 Isolamento de CMSP de cães e obtenção de RNA total

Uma amostra de 25 mL de sangue foi coletada de um cão sadio adulto sem raça definida, por punção da veia cefálica, usando seringa contendo 500 UI de heparina sódica (Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil), acoplada a um dispositivo para infusão endovenosa. A amostra de sangue foi diluída de 1:2 em solução salina balanceada de Hanks (HBSS; Sigma-

Aldrich) tamponada com 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico, pH 7,0 (HEPES; Invitrogen Corporation). Em tubos de polipropileno de 50 mL, dois volumes de sangue diluído foram depositados sobre um volume de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). Após centrifugação a 800 g e a 20°C por 35 min, as células mononucleares foram transferidas para outro tubo e lavadas duas vezes em HBSS tamponada durante centrifugações a 600 g e a 20°C por 15 min. Em seguida, elas foram ressuspensas em meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial (RPMI 1640; Sigma-Aldrich), suplementado com 10 mM de HEPES (pH 7,0), 10% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen Corporation), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 10 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de gentamicina (Nova Farma Ltda., Anápolis, GO, Brasil), aqui denominado meio RPMI completo. A concentração celular foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi avaliada por teste de exclusão por coloração com azul de Trypan (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante.

Com o objetivo de induzir a expressão de RNAm de IL-2, CMSP foram cultivadas na concentração de 1×10^7 /mL em um volume total de 2 mL de meio RPMI completo com 10 µg/mL de concanavalina A (Con-A; Sigma-Aldrich), em placa de Petri de 35 mm de diâmetro (Corning Incorporated Life Sciences, Acton, MA, EUA), a 37°C, em atmosfera úmida com 5% CO₂, por 24 h (BUJDOSO *et al.*, 1995; ABDALLA, *et al.*, 2003). O RNA total de CMSP foi purificado usando Trizol (Invitrogen Corporation), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram lisadas com 1 mL de Trizol e misturadas com 200 µL de clorofórmio. Após incubação à temperatura ambiente por 3 min, o material foi centrifugado a 12.000 g e a 4°C por 15 min. Depois disso, a fase aquosa foi transferida para outro tubo, homogeneizada com igual volume de isopropanol e incubada a temperatura ambiente por 10 min. O RNA precipitado foi centrifugado a 12.000 g e 4°C por 10 min e, posteriormente, lavado com 1

AATGCAACTCTTGTCTTGC, 0,2 μ M de oligonucleotídeo iniciador ajusante 5'CCGGAATTCTCAAGTCAGTGTTGAGAAGATGC, 0,05 U/ μ L de Taq DNA polimerase e tampão de reação (20 mM de Tris-HCl - pH 8,4 e 50 mM de KCl). Depois de um ciclo inicial a 94°C por 2 min e 30 s, a reação de amplificação foi realizada com 35 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de 15 min a 72°C, em termociclador. Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados baseando-se na seqüência de IL-2 canina previamente descrita por Dunham e cols. (1995). O oligonucleotídeo iniciador amontante foi construído com um sítio de restrição para a endonuclease BamHI e seqüência Kozak (KOZAK, 1986), estendendo da posição 4 a 9 e da posição 15 a 21, respectivamente. Já o oligonucleotídeo iniciador ajusante foi construído com um sítio de restrição para a endonuclease EcoRI e um códon de terminação, estendendo da posição 4 a 9 e da posição 10 a 12, respectivamente.

Um volume de 10 μ l da reação de PCR foi analisado através de eletroforese em gel de agarose (Amersham Biosciences) a 1% em tampão Tris-acetato-ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (TAE; 20 mM de Tris, 0,1% v/v de ácido acético e 1 mM de EDTA - pH 8,0) a 80V por 1 h. Uma amostra de marcadores de pares de bases (1 Kb DNA ladder; Invitrogen Corporation) também foi fracionada no gel que, em seguida, foi corado com solução aquosa de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,5 μ g/mL. A migração das bandas presentes no gel foi documentada pelo sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). A PCR resultou na amplificação de um fragmento de DNA com cerca de 494 pb, compatível com o cDNA de IL-2 (468 pb) mais 26 pares de base inseridos nas extremidades pelos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

mL de etanol a 75% (v/v). Após centrifugação a 7.500 g e 4°C por 5 min, o sedimento de RNA foi ressuspenso em 30 µL de H₂O deionizada previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich) a 0,1% (v/v), para inibir RNAses.

A concentração e o grau de pureza do RNA total foram estimados pela medida da D.O. a 260/280 nm em espectrofotômetro de amostras diluídas de 1:200 em H₂O tratada com DEPC a 0,1%.

4.2.3 Síntese do cDNA de IL-2 por reação de transcrição reversa (RT) seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR)

A RT foi realizada em um volume de 10 µL, usando reagentes fabricados pela Invitrogen Corporation. Utilizou-se como molde 50 ng do RNA total, obtido conforme descrito no item 4.1.2, 25 ng/µL de oligonucleotídeo iniciador (Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer), 10 U/µL de transcriptase reversa do vírus Moloney da leucemia murina (M-MLV Reverse Transcriptase), 1 mM de adenosina trifosfato (ATP), 1 mM de timidina trifosfato (TTP), 1 mM de guanina trifosfato (GTP), 1 mM de citosina trifosfato (CTP), tampão de reação (50 mM de Tris-HCl - pH 8,3, 75 mM de KCl e 3 mM de MgCl₂), 2 U/µL de inibidor de RNAses (RNaseOUT) e 0,01 M de ditioneitol (DTT). A reação foi realizada durante 50 min a 42°C e 5 min a 95°C, em termociclador (Mastercycler Gradient; Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

A PCR foi realizada em um volume total de 50 µl, usando reagentes fabricados pela Invitrogen Corporation. Na reação foram usados os 10 µl resultantes da RT contendo cDNA, 0,2 µM de oligonucleotídeo iniciador amontante 5'CGCGGATCCAAGCCACCATGGGCAA

4.2.4 Clonagem do cDNA de IL-2 canina em plasmídeo pcDNA3.1

O produto da PCR, proveniente de 40 μ L da reação, foi fracionado por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio, e purificado com 'kit' de extração de DNA a partir de gel de agarose (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, sob luz ultravioleta uma fatia do gel com aproximadamente 300 mg, contendo moléculas de DNA com peso molecular compatível com cDNA de IL-2 canina, foi excisada e transferida para um microtubo. As moléculas de cDNA foram solubilizadas em tampão QG, precipitadas com isopropanol e aplicadas a uma coluna de sílica-gel. Depois de sucessivas lavagens da coluna com tampão PE, para eliminação de contaminantes e restos de agarose, o cDNA, a partir de agora denominado cDNA de IL-2 canina, foi eluído da coluna com H₂O deionizada autoclavada.

Com o objetivo de gerar extremidades coesivas entre o produto da PCR e o sítio múltiplo de clonagem do vetor, aproximadamente 2 μ g do cDNA de IL-2 canina purificado e 2 μ g de DNA do plasmídeo pcDNA3.1 foram separadamente digeridos. As reações foram realizadas em volumes de 60 μ L, a 37°C, por 1 h, com 4 U de BamHI e 2 U de EcoRI (Fermentas, Hanover, MD, EUA), em tampão de digestão (Y+/Tango; 33 mM de Tris-acetato – pH 7,9, 10 mM de acetato de magnésio, 66 mM de acetato de potássio e 0,1mg/mL de BSA; Fermentas). Os produtos da digestão do cDNA de IL-2 canina e do plasmídeo pcDNA3.1 foram fracionados em gel de agarose a 1% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio e purificados conforme descrito anteriormente.

A reação de ligação entre o cDNA de IL-2 canina e o plasmídeo foi realizada em um volume de 15 μ L, a 16°C durante 16 h. Uma estimativa das quantidades de DNA usadas na

reação foi feita a partir de observação visual de amostras fracionadas em gel de agarose coradas com brometo de etídio. Na reação, foram usados aproximadamente 180 ng do cDNA de IL-2 canina digerido (482 pb) e 20 ng do plasmídeo digerido (5500 pb), 1U de T4 ligase (USB Corporation, Cleveland, Ohio, EUA) em tampão de ligação (66 mM de tampão Tris-HCl - pH 7,6, 6,6 mM de $MgCl_2$, 10 mM de DTT e 66 μ M de ATP; USB Corporation).

Os produtos da ligação foram usados para transformação de *E. coli* da linhagem Top10 (Invitrogen Corporation) por eletroporação, conforme instruções do fabricante. Resumidamente, uma alíquota de 100 μ L de *E. coli* Top10 eletrocompetente, preparada conforme descrito por Sambroock e cols. (2000), foi transferida para uma cuveta de eletroporação de 2 mm de distância entre os eletrodos (Invitrogen Corporation), a qual foram adicionados 1,5 μ L do produto de ligação. A cuveta foi submetida a um pulso de 2,5 V a 200 ohms e 25 μ F em eletroporador (Gene Pulser; Bio-Rad Laboratories). Após a descarga elétrica, o conteúdo da cuveta foi transferido para um microtubo, ao qual foi adicionado 1 mL de meio LB caldo, e incubado a 37°C e 250 rpm por 1 h. Em seguida, placas de Petri com meio de cultura LB-ágar (LB caldo, 1,5% p/v agar – Invitrogen Corporation), contendo 100 μ g/mL de ampicilina, foram semeadas com amostras de 50 e 200 μ L da suspensão de bactéria e cultivadas a 37°C por 16 h. O cultivo de *E. coli* nas placas semeadas com 50 e 200 μ L da suspensão gerou 58 e 214 colônias de bactéria, respectivamente.

4.2.5 Seleção de clones de *Escherichia coli* contendo pcDNA3.1-caIL-2

Visando a seleção de clones de *E. coli* transformadas com a construção pcDNA3.1-caIL-2, amostra de bactérias de 10 colônias, oriundas da placa de Petri semeada com 50 μL do produto da reação de transformação, foram separadamente coletadas e transferidas para tubos de vidro contendo 5 mL de meio LB caldo com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e incubadas a 37°C e 250 rpm por cerca de 14 h. Depois desse período, alíquotas de 800 μL provenientes de cada tubo foram acondicionadas em tubos de criopreservação na presença de 70 μL de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich), congeladas e conservadas a -70°C para uso futuro. Além disso, um volume de 1,5 mL de cada amostra foi separadamente transferido para um microtubo para extração de plasmídeo (mini-preparação) pelo método de lise alcalina (SAMBROOCK *et al.*, 2000). Resumidamente, sedimentos de bactérias foram obtidos após centrifugação e, em seguida, ressuspensos em 100 μL de tampão com 25 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA - pH 8,0 e 50 mM de glicose. Em cada microtubo, as bactérias em suspensão foram lisadas pelo acréscimo de 200 μL de solução aquosa de 0,2 N de NaOH e 1% p/v de dodecil sulfato de sódio (SDS). O DNA cromossômico e o SDS foram precipitados pela adição de 150 μL de solução aquosa de acetato de sódio a 5 M - pH 5,5. Após centrifugação, cada sobrenadante foi transferido separadamente para outro microtubo e o DNA plasmidial foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol absoluto, sedimentado por centrifugação e lavado com etanol a 70% (v/v). Por fim, cada sedimento de DNA plasmidial foi ressuspensão em 50 μL de H₂O deionizada autoclavada contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de RNase A (Sigma-Aldrich).

Amostras de plasmídeos purificados foram submetidas à digestão por 2 U de BamHI e 1 U de EcoRI, em tampão de digestão Y+/Tango (Fermentas), no volume final de 10 μL , a

37°C por 1 h. Em seguida, os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e documentados, conforme descrito no item 4.2.3.

4.2.6 Sequenciamento do cDNA de IL-2 canina clonado em pcDNA3.1

Uma das amostras de plasmídeos compatíveis com a construção pcDNA3.1-caIL-2 foi submetida à reação de seqüenciamento, realizada através de colaboração com Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), conforme descrito no item 4.1.1.

4.2.7 Expressão de IL-2 canina recombinante em células de mamíferos

Células COS-7, de linhagem fibroblástica de rim de macaco verde (CRL-1651, American Type Culture Collection – ATCC; Manassas, VA, EUA), foram transfectadas com a construção pcDNA3.1-caIL-2, através do método de lipofecção, usando lipofectamina (Invitrogen Corporation), conforme recomendações do fabricante. Resumidamente, um milhão de células COS-7, suspensas em 10 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado com 10% SFB, 4 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de gentamicina, a partir daqui denominado de DMEM completo, foram transferidas para cada um de dois frascos de cultura com área de 175 cm² (Corning Incorporated Life Sciences). Depois de 24 h de cultivo a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, quando a monocamada de células aderentes cobria cerca de 50% da área dos frascos, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com DMEM suplementado com 4 mM de L-glutamina. Em seguida, 8 µg de pcDNA3.1-caIL-2 e

pcDNA3.1, previamente purificados com “kit” para purificação de plasmídeos (QIAGEN® Plasmid Mini Kit, QIAGEN), conforme instruções do fabricante, foram separadamente misturados a 40 µL de lipofectamina e uniformemente gotejados sobre as células de cada um dos frascos. Após 5 h de incubação, o meio de transfecção foi descartado e as culturas foram mantidas em 12 mL de DMEM completo por oito dias, durante os quais, a cada dois dias, os sobrenadantes de cultura foram separadamente removidos e um volume de 12 mL de DMEM completo fresco foi acrescentado a cada frasco de cultura.

Após as coletas, os sobrenadantes foram centrifugados a 800 g e a 4°C por 15min, e armazenados a 4°C. Após a última coleta, os sobrenadantes provenientes de cada frasco de cultura foram misturados (cerca de 48 mL) e filtrados, usando membrana de 0,22 µm, aliqüotados e armazenados a -20°C, até o momento de uso.

4.3 ANÁLISE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE

A atividade biológica de rcaIL-2 purificada a partir da produção em *E. coli* ou produzida em sobrenadante de células COS-7 foi determinada pela capacidade da citocina de estimular a proliferação de células CTLL-2 (TIB-214, ATCC). Este clone de células T citotóxicas, originadas de camundongos C57BL/6, é dependente de IL-2 para sua sobrevivência em cultura (GILLIS & SMITH, 1977) e pode ser estimulado a proliferar na presença de IL-2 de várias espécies, incluindo a IL-2 de cão (CERRUTI-SOLA *et al.*, 1984).

Para a realização dos ensaios, células CTLL-2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina, 10% de

SBF (RPMI suplementado) e 10% de sobrenadante de esplenócitos de ratos estimulados com concanavalina A (T-STIM; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), usado na cultura como fonte de IL-2. Na fase exponencial de crescimento, as células foram lavadas três vezes em HBSS tamponada e a concentração de células viáveis em suspensão, estimada por contagem em câmara de Newbauer e coloração por azul de Trypan, foi ajustada para 1×10^5 células/mL. Um volume de 100 μ L da suspensão de células foi transferido para cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato (Corning Incorporated). A nove triplicatas de poços foram acrescentados 100 μ L/poço de RPMI suplementado ou de RPMI suplementado contendo T-STIM (controle positivo) em diluições quádruplas e seriadas de 1:2 até 1:6250. Em um ensaio, foram testadas triplicatas com 100 μ L/poço de diluições seriadas quádruplas de 1:10 até 1:781.250 de 0,1% de BSA (p/v) em PBS (como controle negativo) e de rcaIL-2 renaturada (teste), nas mesmas diluições correspondentes a faixa de concentração protéica de 700 ng/mL a 9 pg/mL. Em um outro ensaio, foram testadas triplicatas com 100 μ L/poço de sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1 (SN COS \emptyset ; controle negativo) ou com pcDNA3.1ca-IL-2 (SN COS rcaIL-2; teste) diluídos dupla e seriadamente de 1:2 até 1:256 em RPMI suplementado.

As células CTLL-2 foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂, por 24 h, e a cada poço foram adicionados 30 μ L de meio RPMI suplementado contendo 1 μ Ci de timidina[H]³⁺ (atividade específica 2 Ci/mmol - Amersham Biosciences). Depois de incubadas por mais 24 h, as células foram coletadas em filtros de fibra de vidro (Packard, Meriden, CT, EUA) e partículas beta emitidas durante o período de um minuto (cpm) foram contadas em aparelho Matrix 9600 Direct Beta Counter (Packard). O resultado do ensaio foi expresso pelas médias aritméticas e desvios-padrão dos valores de cpm das triplicatas de poços tratados com cada diluição testada.

4.4 PRODUÇÃO DE IL-12 CANINA RECOMBINANTE

Sobrenadantes de cultura de células COS-7 contendo IL-12 canina recombinante na forma de cadeia única e biologicamente ativa (SN COS sccaIL-12) foram obtidos através de transfecção com a construção pcDNA3.1-sccaIL-12 (SANTOS *et al.*, 2004), de maneira semelhante ao método descrito no item 4.2.7.

4.5 ANIMAIS

Foram utilizados oito cães saudáveis, sendo quatro machos e quatro fêmeas, com idade estimada entre quatro e oito anos, sem raça definida, com porte de médio a grande. Todos os cães foram mantidos no canil experimental do CPqGM/FIOCRUZ, conforme as Boas Práticas de Experimentação Animal preconizadas para a espécie (OLFERT *et al.*, 1993) e de acordo com as normas de experimentação animal da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram doados ao CPqGM por Centros de Controle de Zoonoses de Municípios do Recôncavo Baiano, incluindo Salvador, Lauro de Freitas e Dias D'Ávila. Esses animais foram submetidos à avaliação imunológica humoral e celular específicas e parasitológica por cultura de aspirado esplênico para determinação de exposição prévia a *L. chagasi/infantum* e os resultados foram negativos.

Os cães foram usados como doadores de sangue venoso para obtenção de CMSP. Cada cão foi contido fisicamente e a veia cefálica foi puncionada para coleta de aproximadamente 25 mL sangue em seringa previamente heparinizada.

4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE DE ESTIMULAR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) DE CÃO

4.6.1 Obtenção e caracterização de CMSP

CMSP foram obtidas de cada animal conforme descrito no item 4.2.2. A concentração de células foi ajustada em 2×10^6 /mL em meio RPMI completo e, para determinação da constituição da população de células isoladas, uma amostra de 100 μ L foi submetida a centrifugação sobre lâminas de vidro a 500 rpm, por 10 min, em citocentrífuga (Cientec, Piracicaba, SP, Brasil) e depois corada pelo Giemsa (Merck, São Paulo, SP, Brasil).

4.6.2 Efeito proliferativo sobre CMSP

Com o objetivo de determinar as condições em que rcaIL-2 é capaz de estimular a proliferação de CMSP, 100 μ L da suspensão de células de cada um de seis cães, na concentração de 2×10^6 /mL, foram transferidos para cada um de 24 poços de cada uma de seis placas de 96 poços de fundo chato. A cada poço de um conjunto de três poços, foram adicionados 100 μ L de meio RPMI completo ou rcaIL-2 expressa em *E. coli* na concentração de 50 ng/mL e SN COS \emptyset ou SN COS rcaIL-2 nas diluições de 1:2, 1:20 e 1:200. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. No 4º, 6º, 8º, 10º, 12º e 14º dia de cultivo, 30 μ L de meio RPMI completo contendo 1 μ Ci de timidina[H]³⁺ foram acrescentados a cada poço de uma das seis placas. Depois de mais 18 h de cultivo, as células foram coletadas em filtros de fibra de vidro

e partículas beta emitidas durante o período de um minuto (cpm) foram contadas em aparelho Matrix 9600 Direct Beta Counter.

4.6.3 Indução da produção de IFN- γ por CMSP

Para avaliação da capacidade de rcaIL-2 de induzir produção de IFN- γ em células homólogas, em associação ou não a IL-12 canina recombinante, 100 μ L de suspensão de CMSP de cada um dos oito cães, na concentração de 2×10^6 /mL, foram colocados em 54 poços de uma placa de 96 poços de fundo chato. Em cada três desses poços, foram acrescentados 100 μ L de: (i) RPMI completo; (ii) Con-A a 5 μ g/mL (controle positivo); (iii) SN COS rcaIL-2 diluído de 1:4; SN COS scca-IL-12 diluído de (iv) 1:10, (v) 1:200 ou (vi) 1:4000; SN COS rcaIL-2 diluído de 1:4, 1:20, 1:100 ou 1:500 em associação com SN COS sccaIL-12 diluído de (vii) 1:10; (viii) 1:200 ou (ix) 1:4000. Depois do cultivo das CMSP por 48h, os sobrenadantes de cada triplicata foram separadamente transferidos para microtubos, centrifugados a 2.000 g por 10 min, transferidos para novos microtubos e armazenados a -20°C até o uso.

A mensuração da concentração de IFN- γ canino presente em sobrenadantes de CMSP, cultivadas conforme descrição acima, foi realizada por ELISA de captura usando-se anticorpos monoclonal (captura) e policlonal biotilado (detecção) anti-IFN- γ canino (R&D Systems Incorporation, Minneapolis, MN, EUA), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, placas de microtitulação de 96 poços ("High Binding"; Corning Incorporated Life Sciences) foram sensibilizadas com 100 μ L/poço de anticorpo de captura na concentração de 2 μ g/mL, durante 16h, à temperatura ambiente. Os poços foram bloqueados com 300 μ L/ poço de PBS - pH 7,4 contendo 1% de BSA, 5% de sacarose e 0,05% p/v de azida sódica, por 1 h.

Diluições duplas e seriadas de IFN- γ canino recombinante (R&D Systems Incorporation) variando de 62,5 pg/mL a 16 ng/mL foram usadas em duplicatas de poços, no volume de 100 μ L/poço, para a curva de calibração. As amostras de sobrenadante de cultura foram testadas em duplicatas com 100 μ L/poço e, quando provenientes do cultivo com Con-A e com as associações de IL-2 e IL-12, foram testadas na diluição de 1:3 em PBS-pH 7,4 contendo 1% de BSA. Após a incubação das amostras por 2 h, os poços foram tratados com 100 μ L/poço de 100 ng/mL de anticorpo de detecção, por 2 h e, em seguida, incubados com 100 μ L/poço de estreptavidina-peroxidase (R & D Systems Incorporated) diluída de 1:200, por 30 min. A reação foi revelada pela adição do substrato tetrametilbenzidina (TMB; Sigma-Aldrich) por 30 min e neutralizada com 50 μ L de H₂SO₄ a 1 M. A leitura da D.O. a 450 nm do conteúdo dos poços foi realizada em espectrofotômetro (Emax Precision Microplate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração de IFN- γ canino presente em cada amostra foi estimada pela comparação dos valores de D.O. das duplicatas de cada amostra com os da curva padrão de IFN- γ canino recombinante, usando o programa Softmax 3.0, corrigidas pelo fator de diluição, quando necessário, e expressas em ng/mL.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação do efeito proliferativo promovido por IL-2 canina recombinante, as médias aritméticas referentes à contagem de emissão radiativa das triplicatas, em cpm, foram comparadas por teste t de Welch.

Para comparação da produção de IFN- γ canino promovida por IL-2, por IL-12 caninas recombinantes ou pela combinação de ambas foi utilizada ANOVA com pós-teste de Dunnett. Para comparação entre a produção de IFN- γ na presença ou na ausência de Con-A foi utilizado teste t de Student.

5 RESULTADOS

5.1 CLONAGEM E EXPRESSÃO DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE

BIOLOGICAMENTE ATIVA EM *E. coli* E EM CÉLULAS DE MAMÍFERO

Visando avaliar, futuramente, a capacidade de IL-2 canina na forma de proteína recombinante, em combinação com IL-12 canina recombinante, de induzir resposta imune celular específica do tipo T_{H1} contra antígenos recombinantes de *L. chagasi/infantum* co-administrados - útil no desenvolvimento de vacina, ou de reverter permanentemente a resposta imune específica T_{H2} para T_{H1} em cães com LV tratados com quimioterapia - útil no desenvolvimento de imunoterapia, recentemente, em nosso laboratório, o cDNA de IL-2 canina desprovido de seqüência líder, foi subclonado em pRSET por PCR a partir do vetor de clonagem pcRIIcaIL-2, gerando a construção pRSET-caIL-2 (RODRIGUES *et al.*, comunicação pessoal).

No presente trabalho, a série de nucleotídeos determinada pelo seqüenciamento do inserto mostrou 99% de identidade com o segmento da seqüência de cDNA que codifica IL-2 canina madura. A comparação entre o cDNA subclonado em nosso laboratório e a seqüência previamente descrita por Dunham e cols. (1995) revelou dois nucleotídeos diferentes, na posição 127 (C =>T), resultando na troca conservativa de fenilalanina por leucina, e na posição 183 (G=>A), que não acarreta em mudança no aminoácido codificado.

A IL-2 canina recombinante (rcalL-2) foi expressa na forma de corpúsculos de inclusão enriquecidos com a proteína recombinante em *E. coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS transformada com a construção pRSET-caIL-2 (figura 1A). Como a construção pRSET-caIL-2 promove a expressão de IL-2 como proteína de fusão com seis moléculas de histidina na

extremidade amina da cadeia polipeptídica, depois de solubilizada em uréia, a proteína foi purificada por cromatografia de afinidade. A rcaIL-2 purificada foi renaturada por diálise em tampões contendo concentrações decrescentes de uréia e DTT, sem que houvesse formação de agregados insolúveis. No final do processo, a rcaIL-2 foi obtida na forma solúvel na concentração de 7 $\mu\text{g/mL}$ e acrescentada a 0,1% de BSA (Figura 1B). A concentração de LPS na amostra foi determinada em 25 ng/mL .

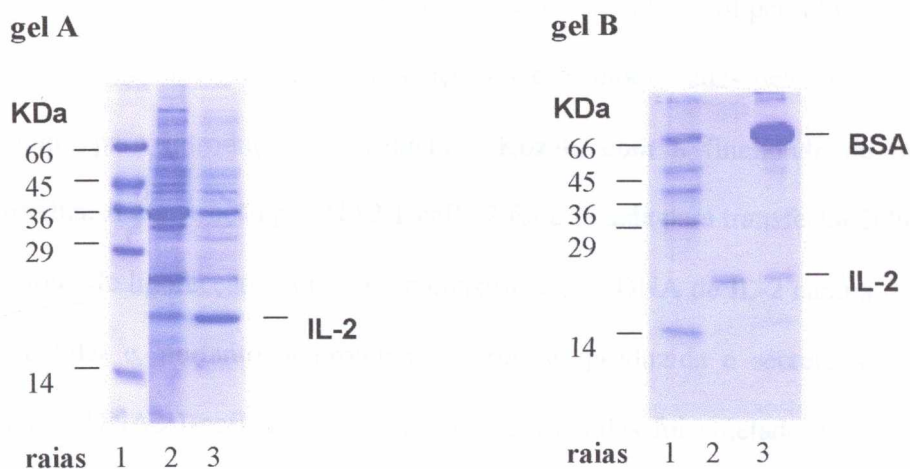


Figura 1. Produção de IL-2 canina recombinante em *E.coli*. A construção pRSET-caIL-2 foi usada para transformação de BL21(DE3)pLysS e, após indução com 1 mM de IPTG durante 5 h, a rcaIL-2 foi expressa na forma de agregados citoplasmáticos insolúveis. Após solubilização com uréia, a proteína foi purificada por cromatografia e renaturada por diálise. Amostras obtidas após expressão e durante as subseqüentes etapas de purificação e renaturação da proteína foram analisadas por SDS-PAGE a 15% corado por azul de Comassie. Marcadores de peso molecular (raias 1) estão indicados à esquerda de ambos os géis. Gel A - raia 2, lisado de *E. coli* BL21(DE3)pLysS expressando rcaIL-2; raia 3, corpúsculos de inclusão enriquecidos com IL-2 canina recombinante; gel B - raia 2, IL-2 canina recombinante purificada por cromatografia de afinidade; raia 03, IL-2 canina recombinante renaturada após diálise e diluída em 0,1% de BSA.

Visando a obtenção de plasmídeo codificando IL-2 canina, apropriado para expressão *in vivo* a ser também testado no desenvolvimento de uma vacina e/ou imunoterapia contra LV canina, foi confeccionada a construção pcDNA3.1-caIL-2. Para isso, a seqüência de cDNA de IL-2 foi sintetizada por RT-PCR a partir de RNA total de CMSP de cão estimuladas com concanavalina A (Con-A) e inserida no vetor, gerando a construção pcDNA3.1ca-IL-2. A análise da digestão restritiva das amostras de plasmídeo originadas das 10 colônias de bactéria selecionadas exibiram duas bandas de DNA com peso molecular compatível com cDNA de IL-2 canina (479 pb) e plasmídeo pcDNA3.1 linearizado (5500 pb), sugerindo sucesso na geração da construção pcDNA3.1-caIL-2. O seqüenciamento do inserto revelou 100% de identidade com a seqüência descrita por Dunham e cols. (1995), que codifica a cadeia polipeptídica completa de IL-2 canina, com exceção das guaninas nas posições 4 e 5, modificadas pelo oligonucleotídeo iniciador amontante para introdução da seqüência Kozak, com a finalidade de otimizar a expressão da proteína. A construção pcDNA3.1-caIL-2 foi utilizada para transfectar células COS-7, através do método de lipofecção. Como nesta construção, o cDNA de IL-2 canina foi clonado com a seqüência líder e, portanto, a proteína deveria ser produzida e secretada por células transfectadas com pcDNA3.1-caIL-2, o sobrenadante das células foi coletado a cada dois dias durante oito dias de cultura e misturado antes de ser submetido a análise da expressão da rcaIL-2.

Para avaliar a atividade biológica de rcaIL-2 produzida em *E. coli* ou secretada por células COS-7, transformadas com pRSET-caIL-2 ou transfectadas com pcDNA3.1-caIL-2, respectivamente, realizaram-se ensaios de proliferação de células CTLL-2. Como controle positivo do ensaio, foi usado sobrenadante do cultivo de esplenócitos de rato estimulados com Con-A (T-STIM), que contém IL-2, em diluições seriadas quádruplas de 1:2 a 1:6.250 e, para determinar a proliferação basal, as células foram cultivadas apenas com meio de cultura.

No experimento onde foi avaliada a atividade biológica de IL-2 produzida em *E. coli*, as células CTLL-2 exibiram 17 ± 3 cpm (média e desvio padrão) quando cultivadas apenas com meio de cultura, enquanto que as células estimuladas com T-STIM nas diluições de 1:2 e 1:10 apresentaram 29.246 ± 5.644 e 74.806 ± 7.919 cpm, respectivamente. Diluições subsequentes de T-STIM revelaram valores de cpm progressivamente menores atingindo a linha de base com 14 ± 2 cpm na diluição de 1:6.250 (Figura 2A), compatível com uma curva de dose-resposta. Na presença de rcaIL-2, as células CTLL-2 apresentaram valores máximos de cpm (20.952 ± 1.432) quando tratadas com 140 ng/mL da proteína e 20 µg/mL de BSA adicionada como excipiente. Concentrações menores, variando de 28 ng/mL a 220 pg/mL, assim como a maior concentração de rcaIL-2 utilizada (700 ng/mL) induziram resposta proliferativa acima da proliferação basal, porém inferior à causada por rcaIL-2 a 140 ng/mL. As células CTLL-2 cultivadas em meio de cultura, ao qual foi adicionada BSA em concentrações semelhantes às usadas como excipiente nas amostras de rcaIL-2, apresentaram valores de cpm na mesma ordem de magnitude da proliferação basal (Figura 2B).

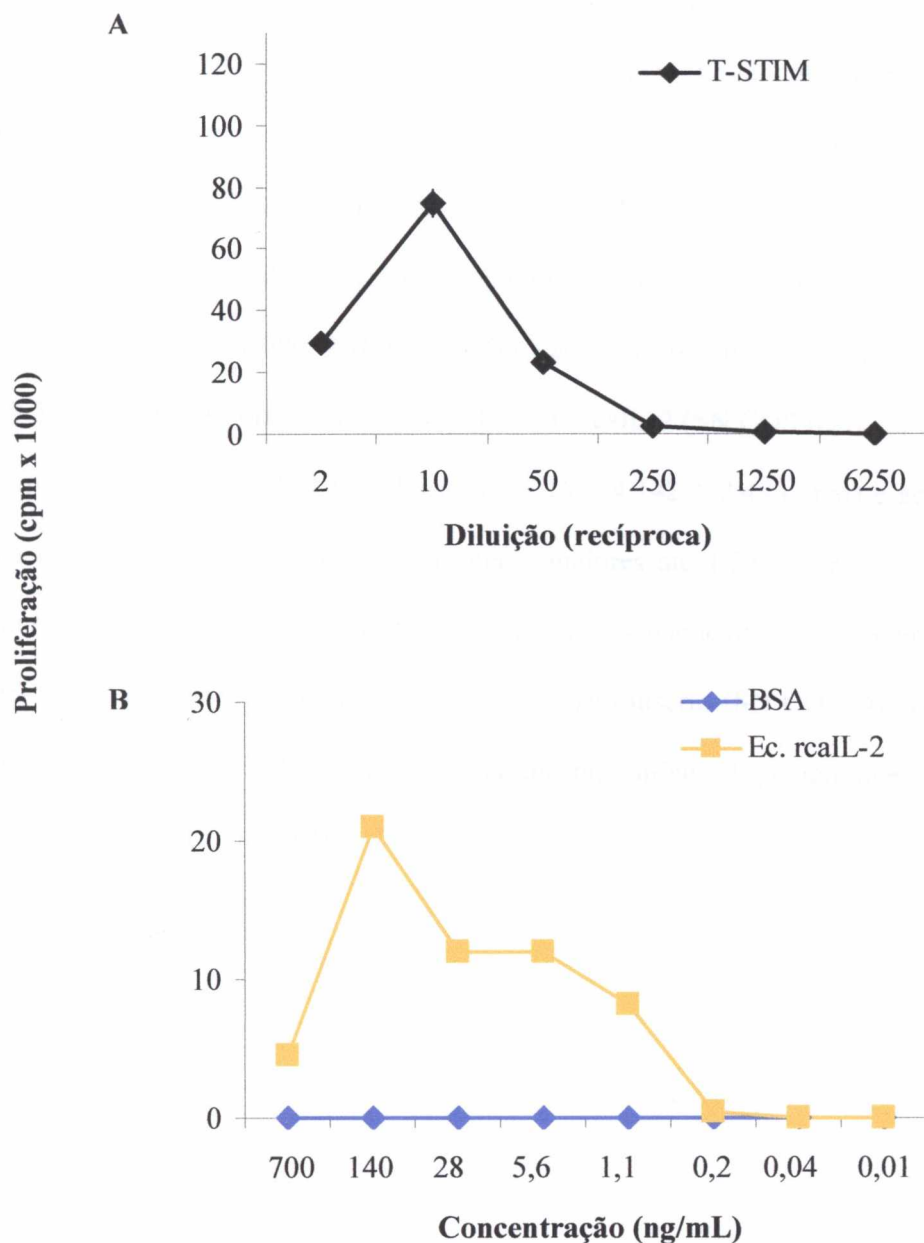


Figura 2. Atividade biológica de IL-2 canina recombinante produzida em *E. coli* sobre células CTLL-2. Células CTLL-2 foram estimuladas a proliferar durante 48h na presença de diluições seriadas de sobrenadante de esplenócitos de rato contendo IL-2 (T-STIM) e de rcaIL-2 produzida em *E. coli* e pulsadas com timidina $[H]^{3+}$ durante as últimas 24 horas. A proliferação celular é representada pelo valor das médias de cpm de cada triplicata de estímulo. A variação média dos valores de cpm das triplicatas em relação às médias foi de 30%. O gráfico A representa a proliferação promovida por T-STIM no ensaio em que células CTLL-2 foram estimuladas com rcaIL-2. O gráfico B representa a comparação entre a proliferação induzida por rcaIL-2 e seu excipiente (BSA a 0,1%).

No experimento realizado para a avaliação de atividade biológica de rcaIL-2 expressa por células COS-7, os valores de cpm obtidos de CTLL-2 cultivadas somente com meio apresentaram a mesma ordem de magnitude dos observados no experimento descrito acima (7 ± 2 cpm). As células CTLL-2 estimuladas com T-STIM mostraram uma curva dose-resposta, com padrão semelhante ao do experimento anterior, porém com valores de cpm mais elevados, chegando a atingir 121.000 ± 10.817 na diluição de 1:10 (Figura 3A). Sobrenadante de células COS-7 transfectadas com a construção pcDNA3.1-caIL-2 (SN COS rcaIL-2) induziu proliferação máxima em células CTLL-2 na diluição de 1:16 (24.142 ± 2.483 cpm) e acima dos valores da linha de base em diluições progressivamente maiores até 1:256. Por outro lado, em diluições menores que 1:16, a resposta proliferativa foi progressivamente menor. Sobrenadante de células COS-7 transfectadas com plasmídeo pcDNA3.1 sem inserto (SN COS \emptyset), usado como controle negativo, determinou valores de cpm da mesma ordem de magnitude que os valores da proliferação basal (Figura 3B).

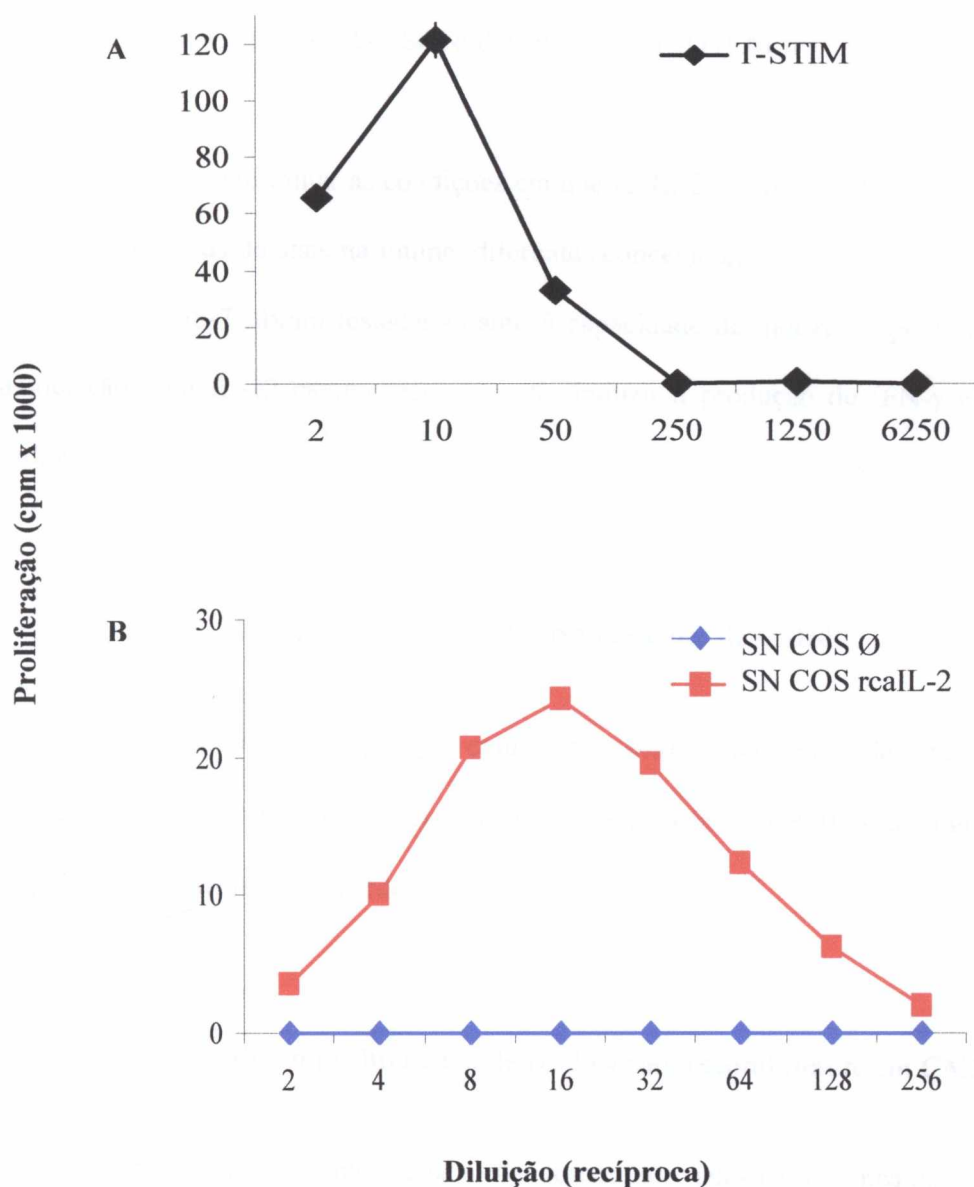


Figura 3. Atividade biológica de IL-2 canina recombinante produzida em COS-7 sobre células CTLL-2. Células CTLL-2 foram estimuladas a proliferar durante 48h na presença de diluições seriadas de sobrenadante de esplenócitos de rato contendo IL-2 (T-STIM) e de sobrenadantes de COS-7 transfectadas com pcDNA3.1-caIL-2 (SN COS rcaIL-2) e pulsadas com timidina $[H]^3$ durante as últimas 24 horas. A proliferação celular é representada pelo valor das médias de cpm de cada triplicata de estímulo. A variação média dos valores de cpm das triplicatas em relação às médias foi de 30%. O gráfico A representa a proliferação promovida por T-STIM no ensaio em que células CTLL-2 foram estimuladas com SN COS rcaIL-2. O gráfico B representa a comparação entre a proliferação induzida por SN COS rcaIL-2 e o sobrenadante controle resultante da transfecção de células COS-7 com pcDNA3.1 (SN COS Ø).

5.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE IL-2 CANINA RECOMBINANTE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)

Para determinar as condições em que rcaIL-2 é capaz modificar a resposta *in vitro* de células homólogas do sistema imune, diferentes concentrações de IL-2, produzida por *E. coli* ou por células COS-7, foram testadas quanto à capacidade de induzir resposta proliferativa e, em associação com IL-12 canina recombinante, induzir a produção de IFN- γ em CMSP de cães saudáveis.

5.2.1 Composição celular das preparações de CMSP

A análise da composição celular de CMSP provenientes de oito cães, realizada em lâminas coradas pelo Giemsa, revelou $60 \pm 3\%$ de linfócitos, $30 \pm 10\%$ de monócitos e $10 \pm 10\%$ de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos).

5.2.2 Efeito proliferativo de IL-2 canina recombinante em CMSP homólogas

CMSP provenientes de seis cães foram cultivadas na presença de 50 ng/mL de rcaIL-2 produzida em *E. coli* ou na presença de SN COS rcaIL-2, nas diluições de 1:2, 1:20 e 1:200. Para demonstração dos níveis basais de proliferação, células dos mesmos animais foram mantidas somente com meio de cultura ou com SN COS \emptyset , usado também nas diluições de 1:2, 1:20 e 1:200. As células foram cultivadas por 4, 6, 8, 10, 12 ou 14 dias. Dezoito horas antes da interrupção das culturas, timidina[H]³⁺ foi acrescentada ao meio de cultura e sua incorporação ao

DNA das células foi determinada pela cpm. Os resultados foram expressos como médias e erros padrão dos seis animais e comparados, em cada dia de cultura analisado, por teste t de Welch.

Os valores de cpm obtidos de CMSP cultivadas somente com meio, que representam os níveis basais de proliferação, foram baixos no 4º dia (40 ± 13), a partir do qual aumentaram progressivamente até atingir 193 ± 175 no 12º dia e 117 ± 89 no 14º dia. A proliferação promovida pela rcaIL-2 produzida em *E. coli* (Figura 4A e 4B) foi significativamente maior que os níveis basais até o 12º dia de cultura. A adição da citocina promoveu um aumento de 12 vezes nos valores de cpm no 4º dia (466 ± 116 cpm, $p= 0,0146$), 40 vezes no 6º dia (1652 ± 347 cpm; $p= 0,0056$), 220 vezes no 8º dia (6497 ± 1704 cpm; $p= 0,0127$), 69 vezes no 10º dia (9213 ± 3191 cpm; $p= 0,0090$) e 57 vezes no 12º dia de cultivo (10940 ± 2861 cpm; $p= 0,0133$). No 14º dia, o efeito da adição de IL-2 não promoveu aumento estatisticamente significativo na proliferação basal ($p= 0,0554$).

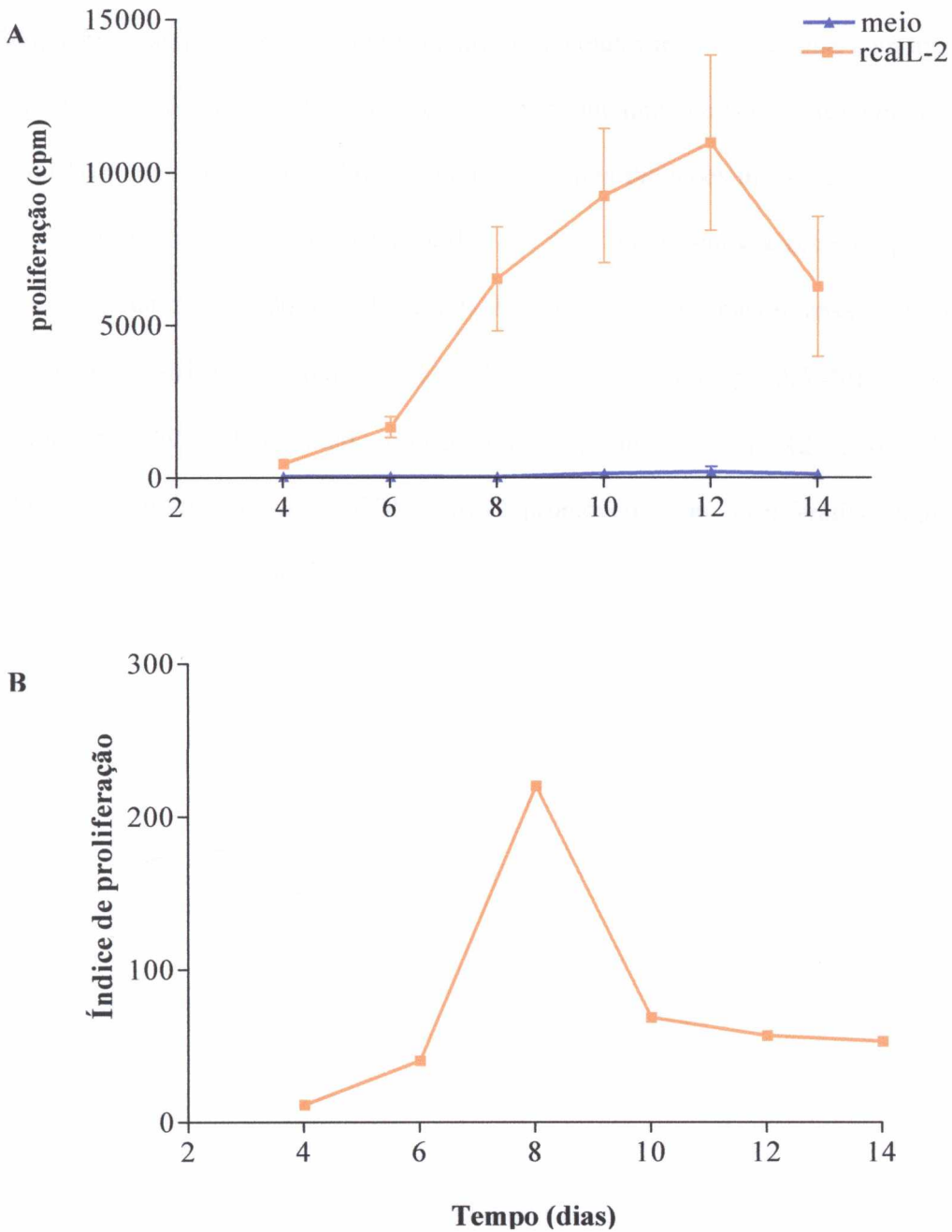


Figura 4. Atividade proliferativa de IL-2 canina recombinante produzida em *E. coli* sobre CMSP. CMSP foram obtidas de seis cães saudáveis, estimuladas a proliferar na presença de rcaIL-2 produzida (rcaIL-2) e pulsadas com timidina $[H]^3$ durante as últimas 18 horas do 4º, 6º, 8º, 10º, 12º e 14º dias de cultura. A proliferação celular é representada pelo valor das médias aritméticas e erros-padrão (barras verticais) de cpm obtidas dos seis cães a partir de cada triplicata de estímulo. O gráfico A representa a comparação entre a proliferação induzida por rcaIL-2 e a proliferação basal determinada pelo meio de cultura. O gráfico B representa a razão entre a proliferação induzida por rcaIL-2 e o meio. Os efeitos promovidos por cada estímulo em cada dia foram comparados por teste t de Welch.

CMSP cultivadas na presença de SN COS Ø, nas diluições utilizadas de 1:2, 1:20 e 1:200, apresentaram valores de cpm semelhantes a células mantidas apenas com meio de cultura. Já as CMSP cultivadas com SN COS rcaIL-2 exibiram aumento significativo de incorporação de timidina[H]³⁺ entre o 4º e o 10º dia de cultura nas três diluições utilizadas de 1:2, 1:20 e 1:200 (figura 5A). A diluição de sobrenadante de 1:20 foi a que promoveu resposta proliferativa mais intensa, seguida da diluição de 1:2 e 1:200. A proliferação foi mais intensa no 8º dia de cultivo mantendo-se a 1961 ± 538 cpm; ($p= 0,0247$), 850 ± 158 cpm; ($p= 0,0040$) e 358 ± 75 com as diluições de 1:20, 1:2, e 1:200, respectivamente (figura 5B). No 12º e 14º dia de cultivo, nenhuma das diluições de SN COS rcaIL-2 promoveu efeito proliferativo significativamente maior que a proliferação basal.

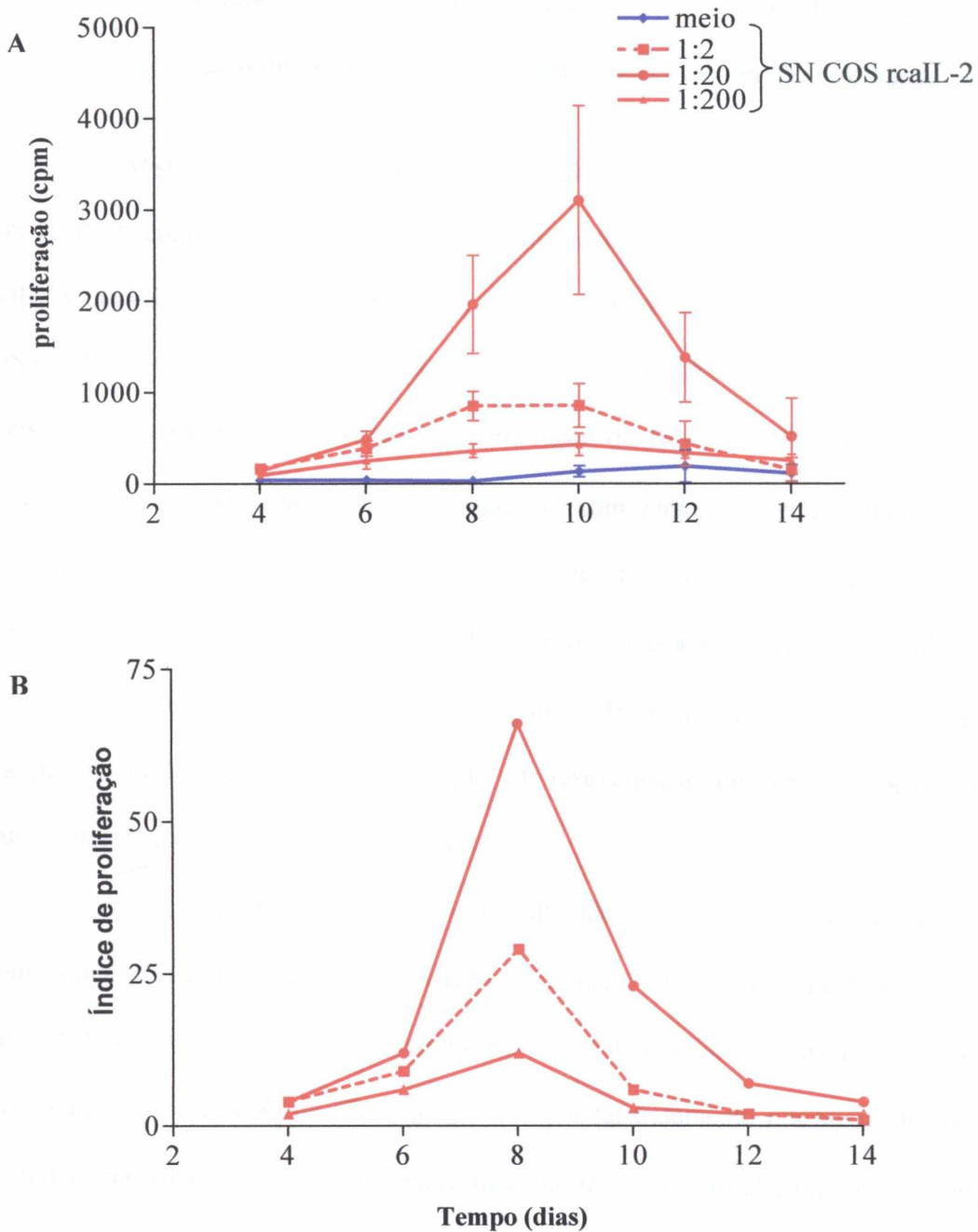


Figura 5. Atividade proliferativa de IL-2 canina recombinante produzida em COS-7 sobre CMSP. CMSP foram obtidas de seis cães saudáveis, estimuladas a proliferar durante 14 dias na presença de diluições seriadas de SN COS rcaIL-2 e pulsadas com timidina $[H]^3+$ durante as últimas 18 horas do 4º, 6º, 8º, 10º, 12º e 14º dias de cultura. A proliferação celular é representada pelo valor das médias de cpm obtidas dos seis cães a partir de cada triplicata de estímulo. As barras verticais representam o erro padrão das médias referentes aos seis animais doadores. O gráfico A representa a comparação entre a proliferação induzida por rcaIL-2 e a proliferação basal determinada pelo meio de cultura. O gráfico B representa a razão entre a proliferação induzida por rcaIL-2 e o meio. Os efeitos proliferativos promovidos por cada estímulo em cada dia foram comparados por teste t de Welch.

5.2.3 Produção de IFN- γ por CMSP estimuladas por IL-2 canina recombinante, associada ou não a IL-12 canina recombinante

CMSP de oito cães sadios foram cultivadas em triplicatas com diluição de 1:4 do SN COS rcaIL-2, com diferentes diluições de sobrenadante de células COS-7 transfectadas com pcDNA3.1sccaIL-12 (SN COS sccaIL-12), ou com a associação de diferentes diluições de SN COS sccaIL-12 combinadas com diferentes diluições de SN COS rcaIL-2. Para determinação dos níveis basais e como controle positivo da produção de IFN- γ , CMSP foram cultivadas pelo mesmo período apenas com meio de cultura ou com meio contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de Con-A, respectivamente. Depois de 48 horas, os sobrenadantes das triplicatas de poços de cultura foram coletados e misturados. A concentração de IFN- γ canino nas amostras foi mensurada por ELISA de captura, usando concentrações entre 62,5 pg/mL e 16 ng/mL de IFN- γ canino recombinante para elaboração de uma curva de calibração. Os resultados foram expressos pelos valores das médias e desvio padrão obtidos dos oito cães.

A produção de IFN- γ por CMSP cultivadas na presença e na ausência de Con-A foram comparadas estatisticamente por teste t de Student, uma vez que a estimulação de CMSP com Con-A foi utilizada apenas como controle positivo do ensaio, não havendo a intenção inicial de se comparar a produção de IFN- γ promovida por tal tratamento e a possivelmente causada pelo tratamento com as citocinas. A concentração de IFN- γ foi de $0,2 \pm 0,2$ ng/mL e $30,1 \pm 22,6$ ng/mL em sobrenadantes de CMSP cultivadas apenas em meio de cultura e em meio contendo Con-A a 5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 4, $p= 0,0022$). Em relação aos níveis basais de expressão, Con-A aumentou a produção de IFN- γ de 9 a 503 vezes em CMSP dos oito cães avaliados.

A comparação da produção basal de IFN- γ com as determinadas pelas citocinas isoladamente foi feita através de ANOVA. Sobrenadante de células COS-7 contendo IL-2 na diluição de 1:4 ($0,5 \pm 0,9$ ng/mL) ou SN COS sccaIL-12, usado nas diluições de 1:10 ($2,1 \pm 2,5$ ng/mL), de 1:200 ($2,3 \pm 3,7$ ng/mL) ou de 1:4000 ($1,6 \pm 2,3$ ng/mL) não induziram produção de IFN- γ em CMSP significativamente maior que a basal ($0,2 \pm 0,2$ ng/mL) promovida apenas pelo meio de cultura (Figura 6).

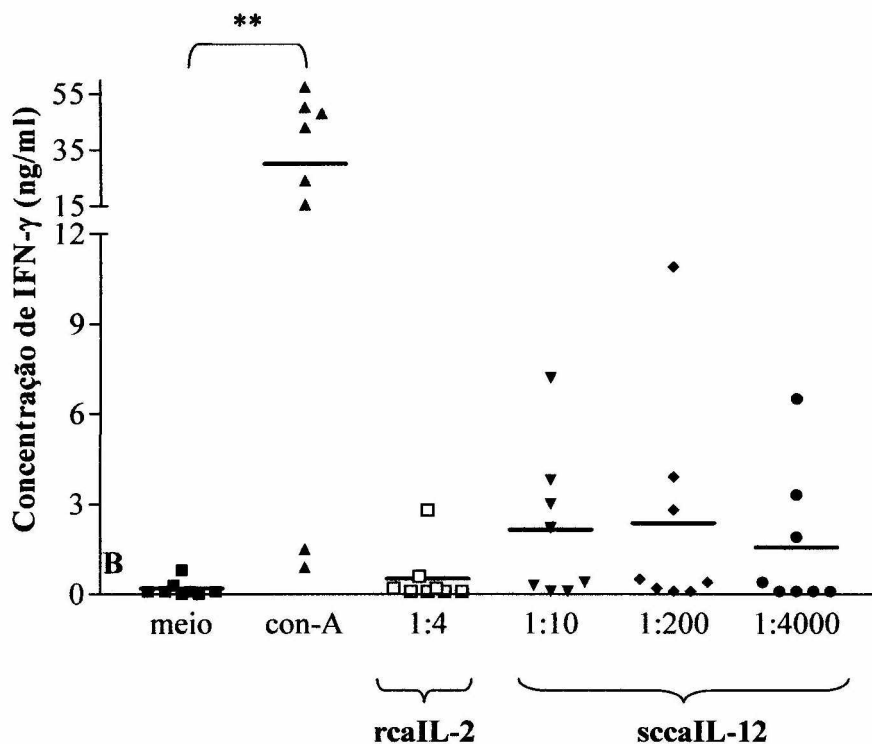


Figura 6. Produção de IFN- γ em sobrenadantes de CMSP estimuladas com IL-2 ou IL-12 caninas recombinantes. CMSP foram obtidas de oito cães saudáveis e cultivadas por 48 h com meio (produção basal), Con-A a 5 $\mu\text{g/mL}$ (controle positivo), SN COS sccaIL-12 diluídos de 1:10, 1:200 ou 1:4000 ou SN COS rcaIL-2 diluído de 1:4. A concentração de IFN- γ foi mensurada nos sobrenadantes de cultura por ELISA de captura. Os símbolos e barras horizontais representam os valores obtidos de cada animal e a média da população, respectivamente. A produção de IFN- γ induzida por Con-A foi comparada através de teste t de Student (** $p=0,0022$), enquanto que a produção promovida pelas citocinas foi comparada por ANOVA, com a produção basal.

Quando a produção de IFN- γ por CMSP cultivadas na presença de SN COS sccaIL-12 na diluição de 1:10 isoladamente ($2,1 \pm 2,5$ ng/mL) e em combinação com SN COS rcaIL-2 nas diluições de 1:4 ($12,7 \pm 13,6$ ng/mL), 1:20 ($5,1 \pm 7$ ng/mL), 1:100 ($5,2 \pm 7,1$ ng/mL) ou 1:500 ($4,4 \pm 5,1$ ng/mL) foi comparada com a produção de IFN- γ de CMSP cultivadas apenas com meio de cultura, através de ANOVA, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,0294$).

A análise realizada pelo pós-teste estatístico de Dunnett indicou que somente a combinação de SN COS sccaIL-12 na diluição de 1:10 e SN COS rcaIL-2 na diluição de 1:4 induziu produção de IFN- γ significativamente maior que os níveis basais (Figura 7A).

Comparações semelhantes às descritas acima foram separadamente realizadas para avaliar a produção de IFN- γ por CMSP cultivadas na presença de SN COS sccaIL-12 nas diluições de 1:200 ou 1:4000 associadas ou não a diluições de 1:4, 1:20, 1:100 e 1:500 de SN COS rcaIL-2 e com meio de cultura. Nessas duas situações, a ANOVA também revelou diferença significativa entre as condições de cultura ($p= 0,0014$ e $0,0144$, respectivamente). Em tais situações, a análise do pós-teste de Dunnett indicou que as combinações de SN COS sccaIL-12 na diluição de 1:200 e SN rcaIL-2 na diluição de 1:4 ou 1:20 (Figura 7B), ou ainda a combinação de SN COS sccaIL-12 na diluição de 1:4000 e SN COS rcaIL-2 na diluição de 1:4 promoveram aumento da produção de IFN- γ (Figura 7C) quando comparadas com a produção basal.

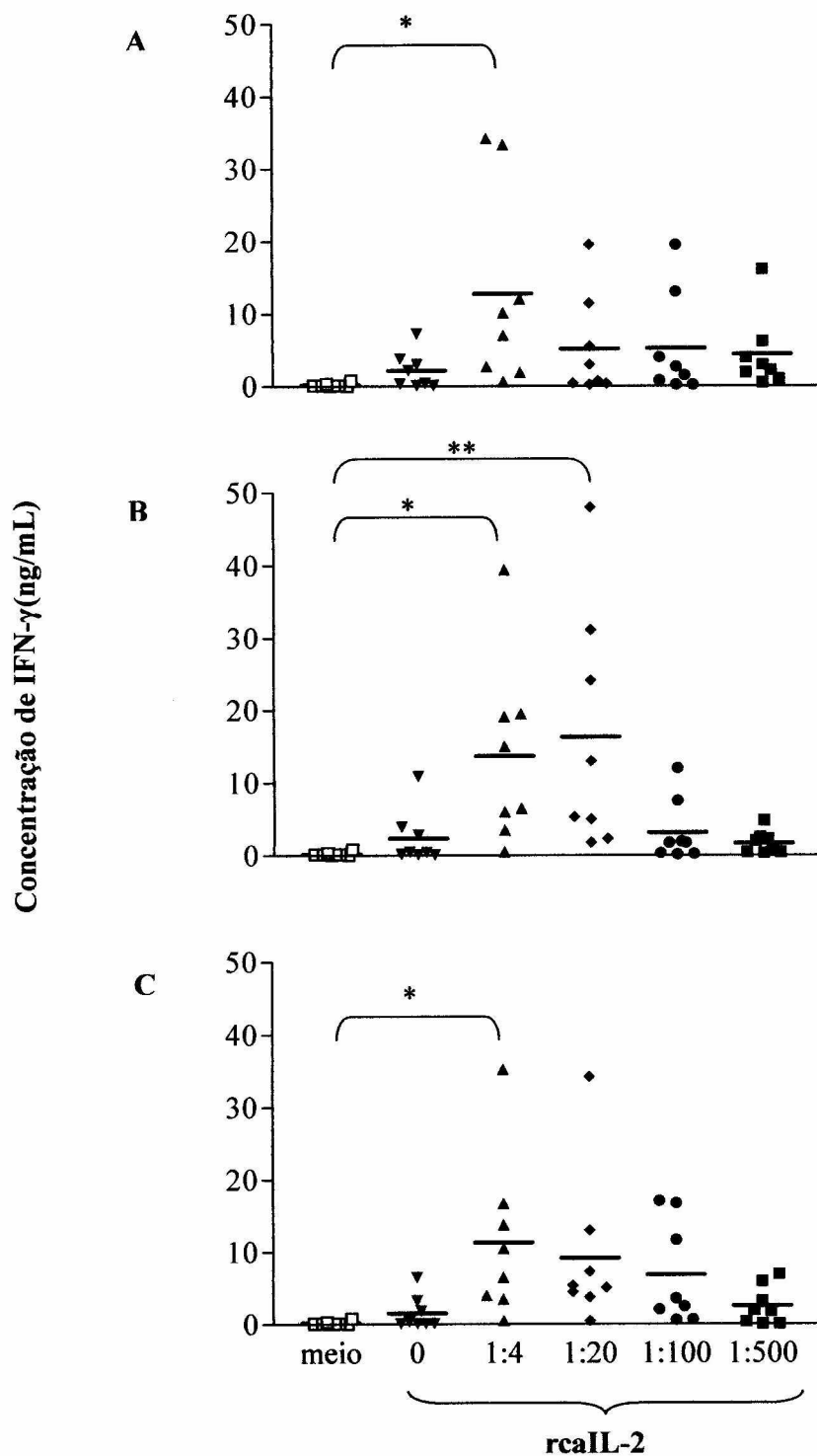


Figura7. Produção de IFN- γ em sobrenadantes de CMSP estimuladas com associações de IL-2 e IL-12 caninas recombinantes. CMSP foram obtidas de oito cães saudáveis e estimuladas por 48h com meio (produção basal), com diferentes diluições de SN COS sccaIL-12 isoladamente ou associadas a SN COS caIL-2 diluídos de 1:4, 1:20, 1:100 e 1:500. A concentração de IFN- γ foi mensurada nos sobrenadantes de

cultura por ELISA de captura. Os símbolos e barras horizontais representam os valores obtidos de cada animal e a média da população, respectivamente. Os gráficos A, B e C mostram a produção de IFN- γ após estimulação com IL-12 diluída a 1:10, 1:200 e 1:4000, associada à IL-2, respectivamente. A produção de IFN- γ promovida pela estimulação com cada diluição de IL-12 isolada ou associada às diluições de IL-2 foi comparada por ANOVA e pós teste de Dunnett (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

6 DISCUSSÃO

A obtenção de citocinas, inicialmente produzidas a partir da estimulação de células *in vitro* (MORGAN *et al.*, 1976; KOBAYASHI *et al.*, 1989) e, posteriormente, em formas recombinantes (TANIGUCHI *et al.*, 1983; GUBLER *et al.*, 1991), vem permitindo o estudo do envolvimento dessas moléculas na resposta imune e a demonstração de sua utilidade como adjuvantes em vacinas ou imunoterápicos utilizados na profilaxia e/ou no tratamento de doenças infecciosas, alérgicas, auto-imunes e neoplásicas.

Visando avaliar a capacidade de citocinas de induzir resposta imune celular específica do tipo T_H1 quando administradas em associação com antígeno(s) recombinante(s) de *L. chagasi/infantum* no cão, uma combinação de IL-2 (rcaIL-2) e IL-12 (sccaIL-12) caninas recombinantes, a ser futuramente testada como candidata a compor uma vacina e/ou imunoterapia contra LV canina, foi analisada, em caráter inicial, no presente trabalho. Aqui, são descritas a clonagem do cDNA e, pela primeira vez, a expressão de rcaIL-2 biologicamente ativa realizada em *E. coli* e em células COS-7, uma linhagem de células de mamíferos. A atividade biológica de rcaIL-2 foi demonstrada pela indução de proliferação de células CTLL-2 murinas dependentes de IL-2 para sua sobrevivência em cultura. O efeito proliferativo de IL-2 canina recombinante de ambas as formas de rcaIL-2 foi analisado em CMSP de seis cães saudáveis por um período que variou de 4 a 14 dias de cultivo. Finalmente, IL-2 canina recombinante expressa em células COS-7 foi avaliada, na ausência ou na presença de IL-12 canina recombinante, também expressa em células COS-7, quanto a capacidade de induzir a secreção de INF- γ por CMSP de oito cães saudáveis.

Neste trabalho, para expressão de *rcaIL-2* em *E. coli*, foi utilizada a construção pRSET-*caIL-2*, previamente obtida por nosso grupo (RODRIGUES *et al.*, comunicação pessoal). Para elaboração desta construção, apenas a região do cDNA que presumivelmente codifica a proteína madura foi amplificada por PCR e inserida após o segmento de DNA que codifica seis moléculas de histidina, existente no vetor pRSET. Comparada à seqüência do cDNA de IL-2 canina descrita anteriormente por Dunham e cols. (1995), a seqüência do inserto na construção pRSET-*caIL-2* apresenta divergência em dois nucleotídeos nas posições 127 (T=>C) e 183 (A=>G). A diferença na posição 127 resulta na troca conservativa de fenilalanina por leucina no 43º aminoácido da proteína madura e, na posição 183, é silenciosa. Uma vez que a seqüência do inserto no plasmídeo pCRII*caIL-2*, utilizado como molde para síntese do cDNA subclonado em pRSET, havia sido determinada previamente e mostrou-se idêntica ao segmento da seqüência descrita por Dunham e cols. (1995), as diferenças de nucleotídeos encontradas no cDNA de IL-2 canina subclonado no presente trabalho devem-se, provavelmente, a erro de incorporação por parte da Taq polimerase utilizada na reação de PCR (ECKERT & KUNKEL, 1990). Apesar de ter ocorrido erro de incorporação do nucleotídeo na posição 127, é pouco provável que a substituição de um único resíduo de aminoácido por outro com características químicas semelhantes (LEHNINGER *et al.*, 1993) possa resultar em modificações físico-químicas capazes de alterar a estrutura espacial ou as propriedades biológicas apresentadas pela molécula expressa naturalmente.

Em *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com a construção pRSET-*caIL-2*, a *rcaIL-2* foi obtida majoritariamente como agregados insolúveis na fração citoplasmática da bactéria, na forma de corpúsculos de inclusão (SCHOEMAKER *et al.*, 1985). Corpúsculos de inclusão enriquecidos com proteína recombinante heteróloga facilitam o processo de purificação por serem facilmente separados de proteínas solúveis e debris celulares por centrifugação e, em

muitas oportunidades, com um único processo cromatográfico pode-se obter a proteína desejada com até 90% de pureza (GUIZEZ *et al.*, 1993). De fato, neste trabalho, a partir de corpúsculos de inclusão solubilizados com uréia, a proteína recombinante foi obtida por cromatografia de afinidade com grau de pureza em torno de 95%. Para renaturação, a proteína purificada foi submetida à diálise em sucessivos banhos com concentrações decrescentes de agente denaturante (uréia) e redutor (DTT), com o objetivo de promover o remodelamento gradual e a estabilização da cadeia polipeptídica da IL-2 canina recombinante (GUIZEZ *et al.*, 1993; VINCENELLI *et al.*, 2004). Na IL-2 humana, a estabilização da molécula parece resultar da formação de uma ponte dissulfídica entre cisteínas nas posições 58 e 105 da proteína (WANG *et al.*, 1984). Essas cisteínas são conservadas na IL-2 canina (KNAPP *et al.*, 1995). Com o método empregado, obtivemos IL-2 canina recombinante solúvel em solução salina.

Para expressão da citocina em células de mamíferos, o cDNA que codifica a cadeia polipeptídica de IL-2 canina foi clonado por RT-PCR em pcDNA3.1, dando origem a construção pcDNA3.1-caIL-2. O sucesso da clonagem foi confirmado pelo seqüenciamento do inserto de DNA e comparação com as seqüências de IL-2 canina previamente descritas (DUNHAM *et al.*, 1995; KNAPP *et al.*, 1995), com as quais o cDNA clonado apresentou 100% de identidade, com exceção da modificação introduzida para geração da seqüência Kozak (KOZAK, 1986). A construção pcDNA3.1-caIL-2 foi usada para transfecção de células COS-7 e obtenção de IL-2 canina recombinante secretada em sobrenadante de cultura.

A avaliação da atividade biológica de IL-2 canina purificada a partir da expressão em *E. coli* ou presente em sobrenadante de células COS-7 foi realizada em células CTLL-2 murinas, suscetíveis a estimulação por IL-2 canina (CERRUTI-SOLA *et al.*, 1984; HELFAND *et al.*, 1992, MIZUNO *et al.*, 1993). A proliferação de células CTLL-2 induzida por rcaIL-2 mostrou-se dose dependente na faixa de concentração protéica de 140 ng/mL até 220 pg/mL da proteína

expressa em *E. coli* e das diluições de 1:16 até 1:256 de SN COS rcaIL-2. O mesmo efeito dose-dependente foi demonstrado quando as CTLL-2 foram cultivadas na presença de diferentes diluições de sobrenadante de esplenócitos de rato estimulados com Con-A (T-STIM), usado como controle-positivo do ensaio por conter IL-2. Entretanto, a magnitude da proliferação induzida por ambas as formas de rcaIL-2 foi menor que a induzida pelo controle positivo. Tal efeito, provavelmente, decorre do fato de que, além de IL-2, o T-STIM contém outro(s) fator(es) de crescimento como, por exemplo, IL-4 que também é capaz de estimular a proliferação de células CTLL-2 (GILLIS *et al.*, 1978; HU-LI *et al.*, 1989). Interessantemente, as maiores concentrações de IL-2 utilizadas, 700 ng/mL da proteína expressa em *E. coli* e diluições de 1:2 a 1:8 de SN COS rcaIL-2, ou mesmo T-STIM na diluição de 1:2, não promoveram proliferação de células CTLL-2 na intensidade máxima. Isso, provavelmente, decorreu de atividade inibitória ou tóxica de concentrações elevadas de IL-2, conforme anteriormente descrito em linfócitos humanos (LAKHANPAL *et al.*, 1987).

Visando determinar as condições em que rcaIL-2 é capaz de induzir efeitos biológicos *in vitro*, de modo a facilitar a interpretação de futuros experimentos de modulação da resposta imune em cães, foram realizados ensaios nos quais a proliferação de CMSP de seis cães sadios cultivadas na presença de rcaIL-2 foi mensurada. A proliferação celular promovida pela adição de rcaIL-2 expressa em *E. coli* na concentração de 50 ng/mL foi observada do 4º ao 12º dia, atingindo o pico no 8º dia do ensaio. Os efeitos de IL-2, purificada após secreção por células caninas, sobre a proliferação de CMSP homólogas, na ausência de estímulo prévio ou concomitante, ainda não foram descritos na literatura para que comparações com os dados obtidos no presente trabalho possam ser feitas. Contudo, resultados semelhantes aos nossos foram relatados quando IL-2 humana recombinante foi utilizada a 25 U/mL para induzir proliferação de CMSP de cinco cães sadios e o efeito proliferativo foi demonstrado a partir de cinco dias de

tratamento, atingindo o ponto máximo entre o 8º e 10º dia de cultivo (HELFAND *et al.*, 1992). Análises da população de CMSP humanas responsivas à estimulação exógena com IL-2 demonstraram que em torno de 10% da população de linfócitos (TAYLOR *et al.*, 1986) e células NK (LAKHANPAL *et al.*, 1987; CALIGIURI *et al.*, 1990), que expressam o receptor de IL-2, proliferam na presença da citocina.

Uma explicação alternativa para a proliferação induzida pela preparação de rcaIL-2 obtida de *E. coli* seria o possível efeito de LPS sobre a ativação de CMSP. Um efeito proliferativo foi demonstrado em linfócitos humanos, quando estes foram estimulados com concentrações acima de 100 ng/mL de LPS (MATTERN *et al.*, 1994; ULMER *et al.*, 2000). Para rechaçar esta possibilidade, a concentração de LPS na amostra de proteína purificada foi mensurada e correspondeu a 0,18 ng/mL nos poços de cultura, muito inferior àquela concentração necessária para induzir proliferação em células humanas (MATTERN *et al.*, 1994; ULMER *et al.*, 2000). Isso sugere que é improvável que o efeito proliferativo observado decorra da presença de tal contaminante.

Em nossos experimentos, a proliferação celular foi avaliada somente a partir do 4º dia de cultivo. Neste momento da cinética, a incorporação de timidina radioativa por CMSP tratadas com 50 ng/mL de rcaIL-2 purificada foi 12 vezes maior que a incorporação basal. Provavelmente, a proliferação de CMSP resultante da estimulação com IL-2 pode ter início mais precocemente dependendo, possivelmente, da concentração de IL-2 utilizada. De fato, Fenwick e cols, 1988, estudando 10 cães saudáveis, mostraram que concentrações de IL-2 humana acima de 100 U/mL são capazes de promover proliferação celular detectável após 72 horas.

Quando o SN COS rcaIL-2 foi utilizado no tratamento das CMSP, nas diluições de 1:2, 1:20 ou 1:200, o pico de proliferação se manteve no 8º dia (aproximadamente 3.000 CPM) e essa persistiu apenas até o 10º dia de cultivo. Contudo, a magnitude da proliferação foi menor do

que aquela promovida pela proteína recombinante purificada de *E. coli* (aproximadamente 10.000 cpm). Ao longo do período de cultivo, a diluição de sobrenadante que induziu maior efeito proliferativo foi a de 1:20, seguida da diluição de 1:2 e 1:200. As razões para esta diminuição do efeito proliferativo quando CMSP foram cultivados na presença de SN COS rcaIL-2 na diluição de 1:2, não foram determinadas.

A definição das condições em que IL-2, associada ou não a IL-12, é capaz de estimular a produção de IFN- γ por CMSP de cão permitirá a realização de futuros estudos para avaliar a utilidade dessa molécula como moduladora da resposta imune celular do tipo T_H1 em cães. Para definir tais condições, CMSP de oito cães saudáveis foram estimuladas com SN COS rcaIL-2, SN COS sccaIL-12 ou a combinação das duas citocinas. Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou que IL-12 canina recombinante, expressa na forma de cadeia única no sobrenadante de células COS-7 transfectadas com a construção pcDNA3.1-sccaIL-12, induz a expressão de RNAm de IFN- γ em CMSP de cães saudáveis e naturalmente infectados por *L. chagasi/infantum* (DOS SANTOS *et al.*, 2004). No presente estudo, CMSP cultivadas na presença de SN COS rcaIL-2, na diluição de 1:4, não produziram IFN- γ em níveis significativamente maiores que os basais ($p > 0,05$). Estudos realizados no homem mostram que a IL-2 humana recombinante é capaz de induzir produção de níveis detectáveis de IFN- γ por linfócitos periféricos da maioria dos indivíduos quando utilizada em concentrações acima de 100 U/mL, isto é, acima de 10 ng/mL (KOBAYASHI *et al.*, 1989; CHAN *et al.*, 1991). Portanto, é possível que a concentração de IL-2 canina recombinante presente no sobrenadante de COS-7 utilizado neste estudo seja inferior a 10 ng/mL e/ou que células de cão necessitem de maiores quantidades de IL-2 para produzirem IFN- γ *in vitro*. Quando as CMSP foram estimuladas com SN COS sccaIL-12 nas diluições de 1:10, 1:200 ou 1:4000, tampouco houve produção de IFN- γ em níveis significativamente maiores que os basais ($p > 0,05$). Entretanto, a resposta ao estímulo

por IL-12 foi heterogênea na população estudada. Enquanto cinco dos oito cães doadores exibiram aumento médio de apenas duas vezes sobre a produção basal, os outros três cães apresentaram um aumento de 30, 36 e 80 vezes na produção de IFN- γ induzida por SN COS sccaIL-12 diluído de 1:10 e mantiveram esta magnitude de resposta em diluições maiores até 1:4000. É possível que a variação encontrada tenha sido resultante de diferenças no estado de ativação dos linfócitos circulantes de cada cão. Um outro grupo de investigadores relatou que quando CMSP de apenas três cães saudáveis foram estimuladas com 5 ng/mL de IL-12 canina recombinante, IFN- γ foi produzido três vezes mais que o nível basal (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2005).

Interessantemente, concentrações de IL-2 ou de IL-12 que por si só não foram capazes de induzir uma produção de IFN- γ significativamente maior que a produção basal, quando associadas, promoveram efeito até 500 vezes maior que a IL-12 isoladamente. Este efeito sinérgico foi promovido, em diferentes magnitudes, com células de todos os cães utilizados como doadores e foi mais intenso nos animais que responderam menos a IL-12 utilizada isoladamente. Um efeito sinérgico semelhante foi anteriormente descrito em linfócitos humanos do sangue periférico quando estimulados com IL-2 humana recombinante associada a IL-12 humana purificada (KOBAYASHI *et al.*, 1989).

Os resultados descritos no presente trabalho encorajam a avaliação da associação de ambas as citocinas em estudos que visem o estabelecimento de resposta celular específica e predominantemente do tipo Th1 em cães naturalmente infectados por *L. chagasi/infantum*. Em tais estudos, poderão ser utilizadas doses baixas de IL-2 e de IL-12, que acarretariam baixa toxicidade, ineficazes isoladamente, mas capazes de promover efeito biológico quando associadas (KAUFMAN *et al.*, 2002). Para isso, a IL-2 obtida a partir da expressão em *E. coli*

transformada pela construção pRSET-caIL-2 ou a construção plasmidial pcDNA3.1-caIL-2 poderão ser administradas em cães.

Além disso, como um efeito sinérgico sobre a produção de IL-10 já foi descrito em linfócitos T estimulados simultaneamente com IL-2 e IL-12 (JEANNIN *et al.*, 1996) e, na LV, a IL-10 é responsável pela redução da apresentação antigênica por macrófagos e da produção de citocinas por células T_{H1} ou NK, acarretando em inibição da resposta imune celular (BARRALNETTO *et al.*, 1998), a indução da expressão de IL-10 pela associação de IL-2 e IL-12 caninas recombinantes, assim como seu efeito sobre a resposta imune celular no cão devem ser avaliados.

E finalmente, como recentemente vários estudos têm sugerido que IL-2 é mais importante para a prevenção contra autoreatividade e que IL-15 participa no estabelecimento de células de memória (WALDMANN *et al.*, 2002; VILLINGER *et al.*, 2004; STAUBER *et al.*, 2006), no futuro, experimentos deverão ser realizados para comparar a utilidade de IL-2 e de IL-15 (ainda a ser clonada por nosso grupo) caninas recombinantes como adjuvantes de um método imunoterápico e/ou de uma vacina contra leishmaniose visceral canina

7 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos do nosso estudo, podemos concluir que:

1. Interleucina-2 canina recombinante, obtida da purificação do sedimento de *E. coli* ou secretada no sobrenadante de células COS-7, apresenta atividade biológica.
2. IL-2 canina recombinante promove efeito proliferativo em CMSP de cães saudáveis na ausência de estímulo prévio ou concomitante.
3. A combinação de IL-2 e IL-12 caninas recombinantes, secretadas nos sobrenadantes de células COS-7, promove efeito sinérgico sobre a produção de IFN- γ em CMSP de cães saudáveis.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. Philadelphia: Saunders, 2003. 562 p.

ABDALLA, A. O.; KIAII, S.; HANSSON, L.; ROSSMANN, E. D.; JEDDI-TEHRANI, M.; SHOKRI, F.; OSTERBORG, A.; MELLSTEDT, H.; RABBANI, H. Kinetics of cytokine gene expression in human CD4+ and CD8+ T-lymphocyte subsets using quantitative real-time PCR. **Scand. J. Immunol.**, **58**(6):601-606, 2003.

ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **13**(5):537-550, 1991.

ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L.; RENIER, C.; SANCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. **Infect. Immun.**, **70**(6):2763-2771, 2002.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR, B.; JIMENEZ, M.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, **10**(2):298-319, 1997.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZALEZ, F.; SAN ANDRES, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; ET AL. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **88**(4):371-378, 1994.

ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J. C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, R. H., JR.; ET AL. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**(3):251-255, 1995.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **59**(1):53-57, 1998.

ASTE-AMEZAGA, M.; MA, X.; SARTORI, A.; TRINCHIERI, G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. **J. Immunol.**, **160**(12):5936-5944, 1998.

BACELLAR, O.; BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; CARVALHO, E. M. Gamma interferon production by lymphocytes from children infected with *L. chagasi*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **24**(8):791-795, 1991.

BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C. H.; COFFMAN, R. L.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E. M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **173**(6): 1515-1518, 1996.

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D., JR. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**, **154**(4):639-649, 1986.

BAJENOFF, M.; BREART, B.; HUANG, A. Y.; QI, H.; CAZARETH, J.; BRAUD, V. M.; GERMAIN, R. N.; GLAICHENHAUS, N. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. **J. Exp. Med.**, **203**(3):619-631, 2006.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, **106**(4): 315-324, 2002.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SANTOS, S. B.; CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; REED, S. G.; JOHNSON, W. D., JR. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **147**(1):281-284, 1991.

BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human_leishmaniasis/cytokines.bahia.br. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **31**(1):149-155, 1998.

BARRAL, A.; CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M. Suppression of lymphocyte proliferative responses by sera from patients with American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **35**(4):735-742, 1986.

BEERS, M. H.; BERKOW, R. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 1999. 17th. Disponível em: <http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/section13/chapter161/161b.jsp>.

BERRAHAL, F.; MARY, C.; ROZE, M.; BERENGER, A.; ESCOFFIER, K.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**(3):273-277, 1996.

BERTAGNOLLI, M. M.; LIN, B. Y.; YOUNG, D.; HERRMANN, S. H. IL-12 augments antigen-dependent proliferation of activated T lymphocytes. **J. Immunol.**, **149**(12):3778-3783, 1992.

BETTENS, F.; KRISTENSEN, F.; WALKER, C.; BONNARD, G. D.; DE WECK, A. L. Lymphokine regulation of human lymphocyte proliferation: formation of resting G0 cells by removal of interleukin 2 in cultures of proliferating T lymphocytes. **Cell. Immunol.**, **86**(2):337-346, 1984.

BLACKWELL, J. M. Leishmania donovani infection in heterozygous and recombinant H-2 haplotype mice. **Immunogenetics**, **18**(2):101-109, 1983.

BLACKWELL, J. M. Regulation of *Leishmania* populations within the host. V. Resistance to *L. donovani* in wild mice. **J. Trop. Med. Hyg.**, **86**(1):17-22, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**:248-254, 1976.

BRAGA, M. D.; COELHO, I. C.; POMPEU, M. M.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**(5):419-424, 1998.

BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; ALTAMURA, M.; VARVARA, B.; CECI, L. Circulating immune complexes and autoantibodies in canine leishmaniasis. **Parassitologia**, **32**(2):275-281, 1990.

BRANDONISIO, O.; PANUNZIO, M.; FALIERO, S. M.; CECI, L.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **53**(1-2):95-103, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2003. 120p.

BUJDOSO, R.; WILLIAMSON, M.; ROY, D.; HUNT, P.; BLACKLAWS, B.; SARGAN, D.; MCCONNELL, I. Molecular cloning and expression of DNA encoding ovine interleukin 2. **Cytokine**, **7**(3):223-231, 1995.

CABRAL, M.; MCNERNEY, R.; GOMES, S.; O'GRADY, J.; FRAME, I.; SOUSA, J. C.; MILES, M. A.; ALEXANDER, J. Demonstration of natural *Leishmania* infection in asymptomatic dogs in the absence of specific humoral immunity. **Arch. Inst. Pasteur Tunis**, **70**(3-4):473-479, 1993.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, **14**(5):531-539, 1992.

CALIGIURI, M. A.; ZMUIDZINAS, A.; MANLEY, T. J.; LEVINE, H.; SMITH, K. A.; RITZ, J. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. **J. Exp. Med.**, **171**(5):1509-1526, 1990.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **152**(12):5949-5956, 1994.

- CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON, W. D., JR. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, **76**(6):2066-2069, 1985.
- CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; JOHNSON, W. D., JR. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **J. Infect. Dis.**, **165**(3):535-540, 1992.
- CARVALHO, E. M.; TEIXEIRA, R. S.; JOHNSON JUNIOR, W. D. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. **Infect. Immun.**, **33**(2):498-500, 1981.
- CERRUTI-SOLA, S.; KRISTENSEN, F.; VANDEVELDE, M.; DE WECK, A. L. Interleukin 1- and 2-like activities in the dog. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **6**(3-4):261-271, 1984.
- CHAN, S. H.; KOBAYASHI, M.; SANTOLI, D.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. **J. Immunol.**, **148**(1):92-98, 1992.
- CHAN, S. H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J. W.; KOBAYASHI, M.; POSPISIL, M.; YOUNG, H. A.; WOLF, S. F.; YOUNG, D.; CLARK, S. C.; TRINCHIERI, G. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **J. Exp. Med.**, **173**(4):869-879, 1991.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, **141**(21):539-543, 1997.
- CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M. E.; CORONA, M.; LOMBARDI, P.; AVALLONE, L.; PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. J.**, **169**(3):465-467, 2005.
- CILLARI, E.; MILANO, S.; DIELI, M.; MALTESE, E.; DI ROSA, S.; MANSUETO, S.; SALERNO, A.; LIEW, F. Y. Reduction in the number of UCHL-1+ cells and IL-2 production in the peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **146**(3):1026-1030, 1991.
- COOK, G. C. Leishmaniasis: some recent developments in chemotherapy. **J. Antimicrob. Chemother.**, **31**(3):327-330, 1993.
- COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, **186**(9):1314-1320, 2002.

- CROCKER, P. R.; BLACKWELL, J. M.; BRADLEY, D. J. Expression of the natural resistance gene Lsh in resident liver macrophages. **Infect. Immun.**, **43**(3):1033-1040, 1984.
- D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, **178**(3):1041-1048, 1993.
- D'OLIVEIRA JUNIOR, A.; COSTA, S. R.; BARBOSA, A. B.; ORGE, M. D. L. G.; CARVALHO, E. M. Asymptomatic *Leishmania chagasi* infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**(1):15-20, 1997.
- DA COSTA PINHEIRO, P. H.; DE SOUZA DIAS, S.; EULALIO, K. D.; MENDONCA, I. L.; KATZ, S.; BARBIERI, C. L. Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. **Infect. Immun.**, **73**(6):3787-3789, 2005.
- DE JONG, R.; JANSON, A. A.; FABER, W. R.; NAAFS, B.; OTTENHOFF, T. H. IL-2 and IL-12 act in synergy to overcome antigen-specific T cell unresponsiveness in mycobacterial disease. **J. Immunol.**, **159**(2):786-793, 1997.
- DE LUNA, R.; VUOTTO, M. L.; IELPO, M. T.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **70**(1-2):95-103, 1999.
- DEANE, L.; DEANE, M. P. Leishmaniose Visceral Urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, **47**(1):113-128, 1955.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. **O Hospital**, **48**:61-76, 1955.
- DEBLAKER-HOHE, D. F.; YAMAUCHI, A.; YU, C. R.; HORVATH-ARCIDIACONO, J. A.; BLOOM, E. T. IL-12 synergizes with IL-2 to induce lymphokine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK cells. **Cell. Immunol.**, **165**(1):33-43, 1995.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, **14**(5):417-423, 1996.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **95**(3):239-243, 2001.
- DEVOS, R.; PLAETINCK, G.; FIERS, W. Induction of cytolytic cells by pure recombinant human interleukin 2. **Eur. J. Immunol.**, **14**(11):1057-1060, 1984.

- DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, **25**(5):1240-1242, 1997.
- DOS SANTOS, L. R.; BARROUIN-MELO, S. M.; CHANG, Y. F.; OLSEN, J.; MCDONOUGH, S. P.; QUIMBY, F.; DOS SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA, G. G. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **98**(1-2):43-48, 2004.
- DU, C.; SRIRAM, S. Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. **J. Leukoc. Biol.**, **64**(1):92-97, 1998.
- DUNHAM, S. P.; ARGYLE, D. J.; ONIONS, D. E. The isolation and sequence of canine interleukin-2. **DNA Seq.**, **5**(3):177-180, 1995.
- DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**(2):125-130, 1996.
- ECKERT, K. A.; KUNKEL, T. A. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Nucleic Acids Res.**, **18**(13):3739-3744, 1990.
- ETTINGHAUSEN, S. E.; LIPFORD, E. H., 3RD; MULE, J. J.; ROSENBERG, S. A. Systemic administration of recombinant interleukin 2 stimulates in vivo lymphoid cell proliferation in tissues. **J. Immunol.**, **135**(2):1488-1497, 1985.
- EVANS, T. G.; TEIXEIRA, M. J.; MCAULIFFE, I. T.; VASCONCELOS, I.; VASCONCELOS, A. W.; SOUSA ADE, A.; LIMA, J. W.; PEARSON, R. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **J. Infect. Dis.**, **166**(5):1124-1132, 1992.
- EVANS, T. G.; VASCONCELOS, I. A.; LIMA, J. W.; TEIXEIRA, J. M.; MCAULLIFE, I. T.; LOPES, U. G.; PEARSON, R. D.; VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **42**(2):118-1123, 1990.
- FENWICK, B. W.; SCHORE, C. E.; OSBURN, B. I. Human recombinant interleukin-2(125) induced in vitro proliferation of equine, caprine, ovine, canine and feline peripheral blood lymphocytes. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, **11**(1):51-60, 1988.
- FERRER, M. L. **Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis Forum.** Barcelona: Hoechst Roussel, 1999.
- GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, **28**(3):109-123, 2004.:

GALVAO-CASTRO, B.; SA FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human american visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, **56**(1):58-66, 1984.

GAMA, M. E.; COSTA, J. M.; GOMES, C. M.; CORBETT, C. E. Subclinical form of the American visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **99**(8):889-893, 2004.

GHALIB, H. W.; PIUVEZAM, M. R.; SKEIKY, Y. A.; SIDDIG, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; RUSSO, D. M.; REED, S. G. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, **92**(1):324-329, 1993.

GHALIB, H. W.; WHITTLE, J. A.; KUBIN, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; GRABSTEIN, K. H.; TRINCHIERI, G.; REED, S. G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **J. Immunol.**, **154**(9):4623-4629, 1995.

GILLIS, S.; SMITH, K. A. Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. **Nature**, **268**(5616):154-156, 1977.

GOSWAMI, T.; BHATTACHARJEE, A.; BABAL, P.; SEARLE, S.; MOORE, E.; LI, M.; BLACKWELL, J. M. Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter. **Biochem. J.**, **354**(Pt 3):511-519, 2001.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; ORSINI, S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **86**(6):613-620, 1992.

GRANUCCI, F.; VIZZARDELLI, C.; PAVELKA, N.; FEAU, S.; PERSICO, M.; VIRZI, E.; RESCIGNO, M.; MORO, G.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. **Nat. Immunol.**, **2**(9):882-888, 2001.

GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M. J.; PERIBANEZ, M. A.; CASTILLO, J. A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **88**(1-2):13-20, 2002.

GUBLER, U.; CHUA, A. O.; SCHOENHAUT, D. S.; DWYER, C. M.; MCCOMAS, W.; MOTYKA, R.; NABAVI, N.; WOLITZKY, A. G.; QUINN, P. M.; FAMILLETTI, P. C.; ET AL. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**(10):4143-4147, 1991.

GUERRA, J. A.; BARROS, M. L.; FE, N. F.; GUERRA, M. V.; CASTELLON, E.; PAES, M. G.; SHERLOCK, I. A. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **37**(4):305-311, 2004.

GUISEZ, Y.; DEMOLDER, J.; MERTENS, N.; RAEYMAEKERS, A.; PLAETINCK, G.; ROBBENS, J.; VANDEKERCKHOVE, J.; REMAUT, E.; FIERS, W. High-level expression, purification, and renaturation of recombinant murine interleukin-2 from *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.**, **4**(3):240-246, 1993.

GURUNATHAN, S.; STOBIE, L.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; GLAICHENHAUS, N.; IWASAKI, A.; FOWELL, D. J.; LOCKSLEY, R. M.; CHANG, J. T.; WU, C. Y.; SEDER, R. A. Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. **J. Immunol.**, **165**(2):915-924, 2000.

HALDAR, J. P.; GHOSE, S.; SAHA, K. C.; GHOSE, A. C. Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **42**(2):702-707, 1983.

HARMS, G.; PEDROSA, C.; OMENA, S.; FELDMEIERS, H.; ZWINGENBERGER, K. Natural killer cell activity in visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **85**(1):54-55, 1991.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, **169**(1):59-72, 1989.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M. K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **177**(5):1505-1509, 1993.

HELFAND, S. C.; MODIANO, J. F.; NOWELL, P. C. Immunophysiological studies of interleukin-2 and canine lymphocytes. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **33**(1-2):1-16, 1992.

HENNEY, C. S.; KURIBAYASHI, K.; KERN, D. E.; GILLIS, S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. **Nature**, **291**(5813):335-338, 1981.

HO, M.; SIONGOK, T. K.; LYERLY, W. H.; SMITH, D. H. Prevalence and disease spectrum in a new focus of visceral leishmaniasis in Kenya. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **76**(6):741-746, 1982.

HOLADAY, B. J. Role of CD8+ T cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **95**(2):217-220, 2000.

HOLADAY, B. J.; POMPEU, M. M.; JERONIMO, S.; TEXEIRA, M. J.; SOUSA ADE, A.; VASCONCELOS, A. W.; PEARSON, R. D.; ABRAMS, J. S.; LOCKSLEY, R. M. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. **J. Clin. Invest.**, **92**(6):2626-2632, 1993.

HSIEH, C. S.; MACATONIA, S. E.; TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, **260**(5107):547-549, 1993.

HU-LI, J.; OHARA, J.; WATSON, C.; TSANG, W.; PAUL, W. E. Derivation of a T cell line that is highly responsive to IL-4 and IL-2 (CT.4R) and of an IL-2 hyporesponsive mutant of that line (CT.4S). **J. Immunol.**, **142**(3):800-807, 1989.

ILAR. Dogs: laboratory animal management. Washington: National Academy Press, 1994.

ISMAIL, A.; EL HASSAN, A. M.; KEMP, K.; GASIM, S.; KADARU, A. E.; MOLLER, T.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T. G. Immunopathology of post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL): T-cell phenotypes and cytokine profile. **J. Pathol.**, **189**(4):615-622, 1999.

JAIN, J.; LOH, C.; RAO, A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. **Curr. Opin. Immunol.**, **7**(3):333-342, 1995.

JEANNIN, P.; DELNESTE, Y.; SEVESO, M.; LIFE, P.; BONNEFOY, J. Y. IL-12 synergizes with IL-2 and other stimuli in inducing IL-10 production by human T cells. **J. Immunol.**, **156**(9):3159-3165, 1996.

KAUFMANN, Y.; LEVANON, M.; DAVIDSOHN, J.; RAMOT, B. Interleukin 2 induces human acute lymphocytic leukemia cells to manifest lymphokine-activated-killer (LAK) cytotoxicity. **J. Immunol.**, **139**(3):977-982, 1987.

KAUFMAN, H. L.; FLANAGAN, K.; LEE, C. S.; PERRETTA, D. J.; HORIG, H. Insertion of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes into vaccinia virus results in effective anti-tumor responses without toxicity. **Vaccine**, **20**(13-14):1862-1869, 2002.

KAYE, P. M.; BANCROFT, G. J. Leishmania donovani infection in scid mice: lack of tissue response and in vivo macrophage activation correlates with failure to trigger natural killer cell-derived gamma interferon production in vitro. **Infect. Immun.**, **60**(10):4335-4342, 1992.

KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.**, **201**:239-253, 2004.

KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J. A.; EL HASSAN, A. M.; THEANDER, T. G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, **65**(1-2):105-108, 1999.

KNAPP, D. W.; WILLIAMS, J. S.; ANDRISANI, O. M. Cloning of the canine interleukin-2-encoding cDNA. **Gene**, **159**(2):281-282, 1995.

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R. M.; CLARK, S. C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J. Exp. Med.**, **170**(3):827-845, 1989.

KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, **44**(2):283-292, 1986.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**(5259):680-685, 1970.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; SILVEIRA, F. T.; BRAGA, R. R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**(3):517, 1987.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Experimental transmission of *Leishmania chagasi*, causative agent of neotropical visceral leishmaniasis, by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Nature*, **266**(5603):628-630, 1977.

LAKHANPAL, S.; GONCHOROFF, N. J.; HANDWERGER, B. S. Interleukin 2 induces proliferation of normal "resting" human T cells in the absence of other known external stimulation. *Cell. Immunol.*, **106**(1):62-75, 1987.

LANOTTE, G.; RIOUX, J. A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. (author's transl). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **54**(3):277-295, 1979.

LASKAY, T.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur. J. Immunol.*, **23**(9):2237-2241, 1993.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ROMAO, P.; CORTES, S.; ROLAO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RICA CAPELA, M. J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **79**(3-4):273-284, 2001.

LECLERCQ, V.; LEBASTARD, M.; BELKAID, Y.; LOUIS, J.; MILON, G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J. Immunol.*, **157**(10):4537-4545, 1996.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Principles of Biochemistry*. New York: Worth, 1993.

LIEW, F. Y.; MILLOTT, S.; LI, Y.; LELCHUK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon-gamma from host-protective T cells is inhibited by interleukin (IL)3 and IL4 produced by disease-promoting T cells in leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, **19**(7):1227-1232, 1989.

MALEK, T. R.; PORTER, B. O.; CODIAS, E. K.; SCIBELLI, P.; YU, A. Normal lymphoid homeostasis and lack of lethal autoimmunity in mice containing mature T cells with severely impaired IL-2 receptors. *J. Immunol.*, **164**(6):2905-2914, 2000.

MALEK, T. R.; YU, A.; VINCEK, V.; SCIBELLI, P.; KONG, L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity*, **17**(2):167-178, 2002.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **82**(4):566-567, 1988.

MANNA, P. P.; BHARADWAJ, D.; BHATTACHARYA, S.; CHAKRABARTI, G.; BASU, D.; MALLIK, K. K.; BANDYOPADHYAY, S. Impairment of natural killer cell activity in Indian kala-azar: restoration of activity by interleukin 2 but not by alpha or gamma interferon. **Infect. Immun.**, **61**(8): 3565-3569, 1993.

MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; DE SOUZA, W. J.; DE TOLEDO, L. M.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO RDA, S.; SABROZA, P. C.; DE SOUZA, M. A.; RANGEL JUNIOR, F. B.; ET AL. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **80**(3):349-357, 1985.

MATTERN, T.; THANHAUSER, A.; REILING, N.; TOELLNER, K. M.; DUCHROW, M.; KUSUMOTO, S.; RIETSCHER, E. T.; ERNST, M.; BRADE, H.; FLAD, H. D.; ET AL. Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. **J. Immunol.**, **153**(7):2996-3004, 1994.

MATTNER, J.; DONHAUSER, N.; WERNER-FELMAYER, G.; BOGDAN, C. NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection. **Microbes Infect.**, **8**(2):354-362, 2006.

MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, **119**(Pt 3):237-246, 1999.

MC ADAM, A. J.; SHARPE, A. H. Infectious Diseases. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia: Elsevier, 2005. p.343-414.

MEDDEB-GARNAOUI, A.; GRITLI, S.; GARBOUJ, S.; BEN FADHEL, M.; EL KARES, R.; MANSOUR, L.; KAABI, B.; CHOUCANE, L.; BEN SALAH, A.; DELLAGI, K. Association analysis of HLA-class II and class III gene polymorphisms in the susceptibility to mediterranean visceral leishmaniasis. **Hum. Immunol.**, **62**(5):509-517, 2001.

MELLER-MELLOUL, C.; FARNARIER, C.; DUNAN, S.; FAUGERE, B.; FRANCK, J.; MARY, C.; BONGRAND, P.; QUILICI, M.; KAPLANSKI, S. Evidence of subjects sensitized to *Leishmania infantum* on the French Mediterranean coast: differences in gamma interferon production between this population and visceral leishmaniasis patients. **Parasite Immunol.**, **13**(5):531-536, 1991.

MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J. Exp. Med.**, **201**(5): 747-754, 2005.

- MIYAZAKI, T.; LIU, Z. J.; KAWAHARA, A.; MINAMI, Y.; YAMADA, K.; TSUJIMOTO, Y.; BARSOUMIAN, E. L.; PERMUTTER, R. M.; TANIGUCHI, T. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell*, **81**(2):223-231, 1995.
- MIZUNO, S.; FUJINAGA, T.; HAGIO, M. Characterization of dog interleukin-2 activity. *J. Vet. Med. Sci.*, **55**(6):925-930, 1993.
- MOHAMED, H. S.; IBRAHIM, M. E.; MILLER, E. N.; WHITE, J. K.; CORDELL, H. J.; HOWSON, J. M.; PEACOCK, C. S.; KHALIL, E. A.; EL HASSAN, A. M.; BLACKWELL, J. M. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *Eur. J. Hum. Genet.*, **12**(1):66-74, 2004.
- MOMEN, H.; GRIMALDI JUNIOR, G.; DEANE, L. M. Leishmania infantum, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **82**(3):447-448, 1987.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, **18**(9):399-405, 2002.
- MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **71**(3-4):181-195, 1999.
- MORGAN, D. A.; RUSCETTI, F. W.; GALLO, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, **193**(4257):1007-1008, 1976.
- MULLER, I. Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to Leishmania major. *Eur. J. Immunol.*, **22**(12):3063-3069, 1992.
- MURRAY, H. W. Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, **175**(6):1477-1479, 1997.
- MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, **174**(8):4916-4923, 2005.
- MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J. Clin. Invest.*, **72**(1):32-44, 1983.
- MURRAY, H. W.; MIRALLES, G. D.; STOECKLE, M. Y.; MCDERMOTT, D. F. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, **151**(2):929-938, 1993.
- MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral Leishmania donovani. *J. Exp. Med.*, **189**(4):741-746, 1999.

MURRAY, H. W.; OCA, M. J.; GRANGER, A. M.; SCHREIBER, R. D. Requirement for T cells and effect of lymphokines in successful chemotherapy for an intracellular infection. Experimental visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, **83**(4):1253-1257, 1989.

NATHAN, C. F.; MURRAY, H. W.; WIEBE, M. E.; RUBIN, B. Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, **158**(3):670-689, 1983.

NYLEN, S.; MAASHO, K.; SODERSTROM, K.; ILG, T.; AKUFFO, H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. **Clin. Exp. Immunol.**, **131**(3):457-467, 2003.

OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; MACWILLIAM, A. A. **Guide to the Care and Use of Experimental Animals**. Canadian Council on Animal Care, 1993.

OLIVA, G.; GRADONI, L.; CIARAMELLA, P.; DE LUNA, R.; CORTESE, L.; ORSINI, S.; DAVIDSON, R. N.; PERSECHINO, A. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **J. Antimicrob. Chemother.**, **36**(6):1013-1019, 1995.

OLIVEIRA, G. G.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **88**(2):243-248, 1993.

ORTALDO, J. R.; WINKLER-PICKETT, R. T.; BERE, E. W., JR.; WATANABE, M.; MURPHY, W. J.; WILTROUT, R. H. In vivo hydrodynamic delivery of cDNA encoding IL-2: rapid, sustained redistribution, activation of mouse NK cells, and therapeutic potential in the absence of NKT cells. **J. Immunol.**, **175**(2):693-699, 2005.

PAMPIGLIONE, S.; LA PLACA, M.; SCHLICK, G. Studies on mediterranean Leishmaniasis. I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **68**(5):349-359, 1974.

PAMPIGLIONE, S.; MANSON-BAHR, P. E.; LA PLACA, M.; BORGATTI, M. A.; MUSUMECI, S. Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **69**(1):60-68, 1975.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI, G. J.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**(1):39-44, 1996.

PARANHOS-SILVA, M.; NASCIMENTO, E. G.; MELRO, M. C.; OLIVEIRA, G. G.; DOS SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. **Acta Trop.**, **69**(1):75-83, 1998.

- PASA, S.; TOZ, S. O.; VOYVODA, H.; OZBEL, Y. Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. **Vet. Parasitol.**, **128**(3-4):243-249, 2005.
- PEACOCK, C. S.; SANJEEVI, C. B.; SHAW, M. A.; COLLINS, A.; CAMPBELL, R. D.; MARCH, R.; SILVEIRA, F.; COSTA, J.; COSTE, C. H.; NASCIMENTO, M. D.; SIDDIQUI, R.; SHAW, J. J.; BLACKWELL, J. M. Genetic analysis of multicase families of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil: no major role for class II or class III regions of HLA. **Genes Immun.**, **3**(6):350-358, 2002.
- PEARSON, R. D.; SOUZA, A. Q.; JERONIMO, S. M. B. Leishmania species: Visceral (Kalazar), Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. In: MANDELL, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. v.2, p.2831-2845.
- PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J.; RUTTEN, V. P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E. J. Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, **25**(6):1594-1600, 1995.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E. J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum. **Infect. Immun.**, **62**(1):229-235, 1994.
- PINELLI, E.; RUTTEN, V. P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P. F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on Leishmania infantum-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, **67**(1):237-243, 1999.
- PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S. Y.; BROEREN, C. P.; RUITENBERG, E. J.; RUTTEN, V. P. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. **Immunogenetics**, **49**(7-8):696-699, 1999.
- POLI, A.; ABRAMO, F.; MANCIANTI, F.; NIGRO, M.; PIERI, S.; BIONDA, A. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. **Nephron**, **57**(4):444-452, 1991.
- POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). **Acta Trop.**, **38**(4): 383-393, 1981.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of Leishmania infantum by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, **122**(Pt 3):253-261, 2001.

QUINNELL, R. J.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; COURTENAY, O.; DYE, C.; GARCEZ, L. M.; SHAW, M. A.; CARTER, S. D.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, **55**(1):23-28, 2003.

REFAELI, Y.; VAN PARIJS, L.; LONDON, C. A.; TSCHOPP, J.; ABBAS, A. K. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. **Immunity**, **8**(5):615-623, 1998.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; GUESSOUS-IDRISSI, N.; LASRI, S.; NATAMI, A.; RIYAD, M.; BERRAG, B. Immune response against Leishmania antigens in dogs naturally and experimentally infected with Leishmania infantum. **Vet. Parasitol.**, **81**(3):173-184, 1999.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; JAFFE, C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **71**(1):69-76, 1999.

RICKERT, M.; WANG, X.; BOULANGER, M. J.; GORIATCHEVA, N.; GARCIA, K. C. The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. **Science**, **308**(5727): 1477-80, 2005.

SACKS, D. L.; LAL, S. L.; SHRIVASTAVA, S. N.; BLACKWELL, J.; NEVA, F. A. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. **J. Immunol.**, **138**(3):908-913, 1987.

SADICK, M. D.; HEINZEL, F. P.; HOLADAY, B. J.; PU, R. T.; DAWKINS, R. S.; LOCKSLEY, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **J. Exp. Med.**, **171**(1):115-127, 1990.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor, 2000.

SANTOS-GOMES, G. M.; CAPELA, M. J.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with Leishmania infantum. **Acta Trop.**, 2003, **87**(2): 235-44.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMAO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by Leishmania infantum. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **88**(1-2):21-30, 2002.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. **J. Exp. Med.**, **178**(2):567-577, 1993.

SCHOEMAKER, J. M.; BRASNETT, A. H.; MARSTON, F. A. Examination of calf prochymosin accumulation in Escherichia coli: disulphide linkages are a structural component of prochymosin-containing inclusion bodies. **Embo J.**, **4**(3):775-780, 1985.

- SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cell. Microbiol.**, 7(12):1707-1713, 2005.
- SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of Dogs and Cats**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1998.
- SLAPPENDEL, R. J.; TESKE, E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **Vet. Q.**, 19(1):10-13, 1997.
- SMITH, K. A. T-cell growth factor. **Immunol. Rev.**, 51:337-357, 1980.
- SMITH, L. E.; RODRIGUES, M.; RUSSELL, D. G. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and Leishmania-infected macrophages. **J. Exp. Med.**, 174(3):499-505, 1991.
- SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. **Vet. Parasitol.**, 90(1-2):37-45, 2000.
- SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.**, 39(2):560-563, 2001.
- STAUBER, D. J.; DEBLER, E. W.; HORTON, P. A.; SMITH, K. A.; WILSON, I. A. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 103(8):2788-793, 2006.
- STERN, J. J.; OCA, M. J.; RUBIN, B. Y.; ANDERSON, S. L.; MURRAY, H. W. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, 140(11):3971-3977, 1988.
- STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S.; OKANO, F.; JAFFE, C. L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in Leishmania infantum-infected dogs. **Int. J. Parasitol.**, 35(1):63-73, 2005.
- SUNDAR, S.; REED, S. G.; SHARMA, S.; MEHROTRA, A.; MURRAY, H. W. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 56(5):522-525, 1997.
- TABOADA, J.; MERCHANT, S. Protozoal and Miscellaneous Infections. In: ETTINGER, S.; FELDMAN, E. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1995. v.1, p.384-397.
- TANIGUCHI, T.; MATSUI, H.; FUJITA, T.; TAKAOKA, C.; KASHIMA, N.; YOSHIMOTO, R.; HAMURO, J. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. **Nature**, 302(5906):305-310, 1983.

TAYLOR, D. S.; KERN, J. A.; NOWELL, P. C. IL 2 alone is mitogenic only for Tac-positive lymphocytes in human peripheral blood. **J. Immunol.**, **136**(5):1620-1624, 1986.

THORNTON, S.; KUHN, K. A.; FINKELMAN, F. D.; HIRSCH, R. NK cells secrete high levels of IFN-gamma in response to in vivo administration of IL-2. **Eur. J. Immunol.**, **31**(11):3355-3360, 2001.

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

TRINCHIERI, G.; MATSUMOTO-KOBAYASHI, M.; CLARK, S. C.; SEEHRA, J.; LONDON, L.; PERUSSIA, B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. **J. Exp. Med.**, **160**(4):1147-1169, 1984.

TRYPHONAS, L.; ZAWIDZKA, Z.; BERNARD, M. A.; JANZEN, E. A. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. **Can. J. Comp. Med.**, **41**(1):1-12, 1977.

ULMER, A. J.; FLAD, H.; RIETSCHEL, T.; MATTERN, T. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). **Toxicology**, **152**(1-3):37-45, 2000.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990.

UZONNA, J. E.; JOYCE, K. L.; SCOTT, P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. **J. Exp. Med.**, **199**(11):1559-1166, 2004.

VAMVAKIDIS, C. D.; KOUTINAS, A. F.; KANAKOUDIS, G.; GEORGIADIS, G.; SARIDOMICHELAKIS, M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Vet. Rec.**, **146**(24):698-703, 2000.

VAN PARIJS, L.; ABBAS, A. K. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science**, **280**(5361):243-248, 1998.

VIDAL, S.; TREMBLAY, M. L.; GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. **J. Exp. Med.**, **182**(3):655-666, 1995.

VILLINGER, F.; MILLER, R.; MORI, K.; MAYNE, A. E.; BOSTIK, P.; SUNDSTROM, J. B.; SUGIMOTO, C.; ANSARI, A. A. IL-15 is superior to IL-2 in the generation of long-lived antigen specific memory CD4 and CD8 T cells in rhesus macaques. **Vaccine**, **22**(25-26): 3510-21, 2004.

- VINCENNELLI, R.; CANAAN, S.; CAMPANACCI, V.; VALENCIA, C.; MAURIN, D.; FRASSINETTI, F.; SCAPPUCINI-CALVO, L.; BOURNE, Y.; CABBILLAU, C.; BIGNON, C. High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. **Protein Sci.**, **13**(10): 2782-2892, 2004.
- WALDMANN, T. A. The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. **J. Clin. Immunol.**, **22**(2): 51-6, 2002.
- WALKER, E.; LEEMHUIS, T.; ROEDER, W. Murine B lymphoma cell lines release functionally active interleukin 2 after stimulation with *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol.**, **140**(3):859-865, 1988.
- WANG, A.; LU, S. D.; MARK, D. F. Site-specific mutagenesis of the human interleukin-2 gene: structure-function analysis of the cysteine residues. **Science**, **224**(4656):1431-1433.
- WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev.**, **14**(5): 361-368, 2003.
- WEIGENT, D. A.; STANTON, G. J.; JOHNSON, H. M. Interleukin 2 enhances natural killer cell activity through induction of gamma interferon. **Infect. Immun.**, **41**(3):992-997, 1983.
- WILLIAMS, J. M.; ABBUD-FILHO, M.; KELLEY, V. E.; STROM, T. B. Interleukin-2 apparently upregulates its receptor and induces proliferation of various resting mononuclear leukocytes in the absence of antigen. **Cell. Immunol.**, **94**(2):383-393, 1985.
- YE, J.; ORTALDO, J. R.; CONLON, K.; WINKLER-PICKETT, R.; YOUNG, H. A. Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. **J. Leukoc. Biol.**, **58**(2):225-233, 1995.
- ZAPH, C.; UZONNA, J.; BEVERLEY, S. M.; SCOTT, P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nat. Med.**, **10**(10):1104-1110, 2004.
- ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; DURAN, E.; GONZALEZ, M.; MANE, M. C. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Vet. Res.**, **34**(2):137-151, 2003.