



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PRODUÇÃO DE IL-7 CANINA NO SISTEMA BACULOVÍRUS-CÉLULAS DE
INSETO

BÁRBARA MARIA NASCIMENTO DE OLIVEIRA

Salvador – Bahia
2016

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

PRODUÇÃO DE IL-7 CANINA NO SISTEMA BACULOVÍRUS-CÉLULAS DE
INSETO

BÁRBARA MARIA NASCIMENTO DE OLIVEIRA

Orientador: Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira

Co-Orientadora: Dr^a Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro

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

Salvador - Bahia

2016

DEDICATÓRIA

À minha família pelo amor incondicional:

Mãe & Irmã,

Àquele que, mesmo fisicamente distante,

me conforta e incentiva:

Meu amor, Marcos Vinicius Vieira

" PRODUÇÃO IL-7 CANINA NO SISTEMA BACULOVÍRUS-CÉLULAS DE INSETO"

BARBARA MARIA NASCIMENTO DE OLIVEIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

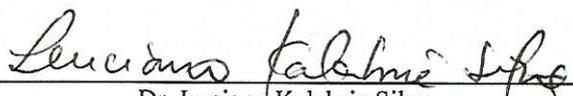
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisadora Titular
CPqGM



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
CPqGM



Dr. Luciano Kalabric Silva
Pesquisador
CPqGM

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro Pesquisas Gonçalo Moniz, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Geraldo Gileno pela oportunidade que me foi dada, pela orientação, confiança e por todo conhecimento transmitido;

À Dr. Cristiane Pinheiro, minha orientadora e norteadora, pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e caráter. Minha eterna gratidão por me ensinar a ser uma profissional e um ser humano melhor;

Às minhas companheiras de pesquisa e amigas do laboratório, Dr. Naiara Carvalho, Msc. Jéssica Mariane e Msc. Catiule Santos, pela grande ajuda nos experimentos, por estarem sempre do meu lado me dando força e apoio e por me confortarem nos momentos frustrantes (que não foram poucos);

Ao grupo GGSO-LPBI: Maria Carolina, Matheus Moreno, Marcus David, Fernanda Gomes, pela ajuda diária e por tornarem meus dias mais divertidos mostrando que o melhor trabalho é feito em equipe;

À Dr. Maria Fernanda Grassi e a Dra. Luana Leandro Gois pelos ensinamentos em marcação com CFSE, citometria de fluxo, FlowJo e por serem sempre tão solícitas em nos auxiliar;

À Dr. Micely Hermida pelas discussões científicas, boa vontade de sempre, pelos ensinamentos de análises de citometria de fluxo e FlowJo e sugestões enriquecedoras;

Aos funcionários Elivani Sacramento (“Livinha”) e Sérgio Vasconcelos (“Serginho”), por estarem sempre dispostos a ajudar e pela realização de procedimentos que facilitam nosso trabalho;

À Ana Maria Fiscina e a todos da biblioteca do CPqGM, pela atenção, eficiência, consultoria e revisão;

À Fundação Oswaldo Cruz- Bahia, pela estrutura em tornar possível o desenvolvimento deste trabalho e fornecimento da bolsa de mestrado;

À minha família, Mãe e Irmã, por todo amor, sacrifício, incentivo a minha vida acadêmica e por serem responsáveis pela pessoa que me tornei;

Ao meu noivo, Marcos Vinicius Vieira, por trazer mais amor e leveza a minha vida, por confiar em mim e, mesmo que distante fisicamente, por me apoiar nos momentos difíceis;

À todos meus amigos que me acompanharam nessa longa jornada e me ajudaram direta ou indiretamente;

Aos animais, cães, essência da experimentação.

OLIVEIRA, Bárbara Maria Nascimento de. Produção de IL-7 canina no sistema baculovírus-células de inseto. 100 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

INTRODUÇÃO. A interleucina 7 (IL-7) é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por células estromais da medula óssea, células epiteliais tímicas e intestinais. IL-7 é que promove o desenvolvimento de linfócitos T e B e diferenciação de células T memória, especialmente CD4⁺. Por isso, diversos autores têm estudado a capacidade de IL-7 promover a restauração da população de linfócitos em situações de linfopenia e resposta imune de memória. Cães que desenvolvem leishmaniose visceral e recebem tratamento específico apresentam cura clínica. No entanto, após a interrupção do tratamento, a maioria dos animais exibe recaída da doença, mesmo na ausência de re-infecção. É possível que esse fenômeno esteja associado a uma dificuldade de estabelecimento de linfócitos T de memória específicos para *Leishmania* em cães. Em nosso laboratório, tentativas prévias foram realizadas para produzir a IL-7 canina em *Escherichia coli*, no entanto, o rendimento da proteína biologicamente ativa foi pequeno. **OBJETIVO.** Por isso, resolveu-se avaliar a viabilidade de produzir IL-7 do sistema baculovírus-células de inseto. **MATERIAL E MÉTODOS.** No presente trabalho, uma construção de DNA foi concebida contendo uma sequência de nucleotídeos que codificam o peptídeo sinal da proteína GP64 do baculovírus da *Autographa californica* (AcMNPV), a IL-7 canina (proteína madura) com códons otimizados para a tradução em *Trichoplusia ni*, um espaçador com 23 aminoácidos e uma cauda de seis histidinas. A construção de DNA elaborada foi sintetizada quimicamente, inserida em um plasmídeo de clonagem (*pUC57-GP64caIL-7*), subclonada em um plasmídeo carreador (*pFastBac1-GP64caIL-7*), adequado para o sistema baculovírus-célula de inseto, e transferida para o cromossoma artificial do baculovírus recombinante (bacmídeo). **RESULTADOS.** A produção de IL-7 recombinante canina (rcaIL-7) em células de inseto infectadas com baculovírus recombinante foi otimizada. Em seguida, a rcaIL-7 foi produzida em células High-five cultivadas em suspensão utilizando multiplicidade de infecção (MOI) de 5 e tempo de infecção (TOI) de 48 h. A proteína recombinantes foi purificada por cromatografia de afinidade em Sepharose-níquel, obtendo-se um rendimento médio de 5,5 mg por litro de cultivo. **CONCLUSÃO.** RcaIL-7 purificada, avaliada a 40 ng/mL, mostrou-se capaz de promover a proliferação de células mononucleares de sangue periférico de cães saudáveis, sem estímulo prévio ou concomitante, indicando que a proteína foi produzida biologicamente ativa. Futuros estudos serão realizados para avaliar a capacidade imunomoduladora da rcaIL-7 em cães e determinar a utilidade dessa citocinas no tratamento de enfermidades caninas, como por exemplo, na leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: Interleucina 7; células mononucleares; cão.

OLIVEIRA, Bárbara Maria Nascimento de. Produção de IL-7 canina no sistema baculovírus-células de inseto. 100 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ABSTRACT

INTRODUCTION. The interleukin 7 is a pleiotropic cytokine produced mainly by bone marrow stromal cells, thymus and intestinal epithelial cells. IL-7 promotes the development of T and B lymphocytes and differentiation T cells to memory cells, especially T CD4⁺ cells. For these reasons, several authors have studied the ability of IL-7 to promote restoration of the lymphocyte population in cases of lymphopenia and memory immune responses. Dogs which develop visceral leishmaniasis and are treated with specific drugs develop only transient clinical cure. After treatment withdrawal, most animals show disease relapse, even in the absence of reinfection. One possible explanation for the lack of control of the infection after treatment in dogs is a difficulty to develop/maintain specific memory T cells. Therefore, it is possible that effective treatments for canine visceral leishmaniasis be developed by manipulating the immune system. Previously, in our laboratory, it was attempted to produce recombinant canine IL-7 (rcaIL-7) in *Escherichia coli*, however there was a low yield of biologically active protein. **OBJECTIVE.** In the current project, the baculovirus-insect cell system was evaluated to produce rcaIL-7. **MATERIAL AND METHODS.** In this study, a construction of DNA was designed to encode nucleotides of *Autographa californica* GP64 signal peptide, canine IL-7 (mature protein) with optimized codons for *Trichoplusia ni*, a 23-amino acid spacer and a six histidine tail. The DNA construct was chemically synthesized, inserted into a cloning plasmid (*pUC57-GP64caIL-7*), subcloned into a carrier plasmid (*pFastBac1-GP64caIL-7*), suited to the baculovirus-insect cell expression system, and transferred to an artificial chromosome of the recombinant baculovirus (bacmid). **RESULTS.** Recombinant protein expression was optimized, then, the rcaIL-7 was produced in a cell culture in suspension using multiplicity of infection (MOI) 5 and time of infection (TOI) 48 hours. Subsequently rcaIL-7 was purified by Nickel Sepharose-Affinity chromatography, obtaining an average yield of 5.5 mg per liter of culture. **CONCLUSION.** The purified recombinant rcaIL-7 at 40 ng/mL was able to induce proliferation of peripheral blood mononuclear cells of heath adult dog, suggesting it was biologically active. Given the results, the rcaIL-7 may be used in further studies to assess its ability to modulate canine immune system, that would be useful for the development immunotherapy.

Keywords: Interleukin 7; mononuclear cells; dog.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Desenho esquemático da construção de DNA usada para a produção de IL-7 canina no sistema baculovírus células de inseto.....	27
Figura 2	Ilustração da subclonagem do inserto <i>GP64caIL-7</i> da construção plasmideal <i>pUC57-GP64caIL-7</i> para o plasmídeo <i>pFastBac1</i>	28
Figura 3	Avaliação por eletroforere em gel de agarose de plasmídeo purificado de <i>E. coli</i> transformada com o produto de ligação entre <i>GP64caIL-7</i> e <i>pFastBac1</i>	42
Figura 4	Avaliação do produto de PCR de bacmídeo por eletroforese em gel de agarose.....	43
Figura 5	Ensaio para a otimização da produção de IL-7 canina em células High-five infectadas com baculovírus recombinante <i>AcBacACC-GP64caIL-7</i>	45
Figura 6	Avaliação da purificação da rcaIL-7 canina por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).....	47
Figura 7	Detecção por <i>Western blot</i> da proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade.....	49
Figura 8	Perfil das amostras marcadas com CFSE e analisadas pelo programa FlowJo.....	51
Figura 9	Proliferação de linfócitos de cão após estimulação com rcaIL-7.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	Menor
Δ gor	Deleção dos genes da enzima glutaredoxina redutase
Δ trxB	Deleção dos genes da enzima tioredoxina redutase
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de Carbono
°C	Grau Celsius
%D	Porcentagem de células divididas
AcMNPV	do inglês, <i>Autographa californica</i> “ <i>nuclear multiple polyhedrosis virus</i> ”
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCA	Ácido bicinconínico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BEVS	Sistema de expressão baseado em baculovírus (do inglês, <i>Baculovirus Expression Vector System</i>)
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
bp	Pares de bases
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês, <i>Bovine serum albumin</i>)
cDNA	DNA complementar
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
<i>cath</i>	Catepsina (do inglês, <i>Cathepsin</i>)
CCZ	Centro de Controle de Zoonose
<i>chi</i>	Quitinase (do inglês, <i>Chitinase</i>)

CFSE	Éster carboxifluoresceína succinimidil (do inglês, <i>Carboxy Fluorescein diacetate Succinimidyl Ester</i>)
CMNSP	Células Mononucleares de Sangue periférico
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Con A	Concanavalina A
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Trifosfato de desoxiguanosina, Trifosfato de desoxiadenosina, Trifosfato de desoxitimidina, Trifosfato de desoxicitidina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EU	Unidades de Endotoxina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico
High-five	Células de linhagem de mariposa <i>Trichoplusia ni</i> (células BTI-Tn-5B1-4)
His	Histidina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
gen	Gentamicina
GP64	Glicoproteína de 64 kDa (sinônimo de gp67)
ID	Índice de divisão celular
IFAT	Técnica de imunofluorescência indireta (do inglês, <i>indirect immunofluorescent antibody test</i>)
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4

IL-5	Interleucina 5
IL-7	Interleucina 7
IL-9	Interleucina 9
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-21	Interleucina 21
IL-7R	Receptor para interleucina-7
IL-7R α	Cadeia alfa do receptor de interleucina-7
IL-7R γ	Cadeia gama comum do receptor de interleucina-7
IPTG	Isopropil-tio-galactosídeo
kan	Kanamicina
Kcl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodáton
kg	Quilograma
LB	Ágar Luria Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
M	Molar
mM	Milimolar
mA	Milliampère
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês, <i>multiplicity of infection</i>)

NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Itroazultetrazólio-dimetil formamidado (inglês, <i>Nitro Blue Tetrazolium</i>)
ng	Nanograma
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monossódico
NaK ₂ PO ₄	Fosfato dipotásico e sódico
NaOH	Hidróxido de sódio
<i>NotI</i>	Endonuclease de restrição
PBS	Tampão fosfato tamponado com salina (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
<i>pFastBac1-GP64caIL-7</i>	Plasmídeo carreador, adequado para expressão no sistema baculovírus-células de inseto, contendo o cDNA que codifica para a IL-7
pfu	Unidade formadora de placa (do inglês, <i>Plaque forming unit</i>)
PHA	Fitohemaglutinina (do inglês, <i>Phytohemagglutini</i>)
<i>pUC57-GP64caIL-7</i>	Plasmídeo de clonagem, doador do gene de interesse
rca	Recombinante canina
rcaIL-7	Interleucina 7 recombinante canina
rhIL-7	Interleucina 7 recombinante humana
RNase	Ribonuclease A
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio 1640 do Instituto Roswell Park Memorial
<i>SalI</i>	Endonuclease de restrição
SBF	Soro bovino fetal
SCID	Síndrome da Imunodeficiência combinada severa (do inglês, <i>Severe combined immunodeficiency</i>)
SDS	Dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês, <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SF9	Linhagem de célula de mariposa da espécie <i>Spodoptera frugiperda</i>
SFM	Meio sem soro (do inglês, <i>Serum Medium Free</i>)
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia (do inglês, <i>simian immunodeficiency virus</i>)
T4-ligase	Enzima de ligação
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TBS – T	TBS + Tween 20
TBS-T-L	TBS + Tween 20 + leite desnatado a 5%
TCID ₅₀	Diluição de vírus capaz de infectar 50% das culturas de células (do inglês, <i>Tissue Culture Infectious Dose</i>)
TCR	Receptores de células T
tet	Tetraciclina
Th	Célula T auxiliadora (do inglês, <i>helper</i>)
Tn	Abreviação, <i>Trichoplusia ni</i>
TNM-FH	Meio de cultura (do inglês, <i>Graces Modified Medium</i>)
TOI	Tempo de infecção (do inglês, <i>Time of infection</i>)
U	Unidade
X-gal	Bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	INTERLEUCINA-7.....	18
2.1.1	Características gerais	18
2.1.2	Papel biológico	19
2.1.3	Aplicação terapêutica	20
2.2	LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)	22
3.	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4.	METODOLOGIA	26
4.1	PRODUÇÃO DE IL-7 CANINA RECOMBINANTE NO SISTEMA- BACULOVÍRUS CÉLULA DE INSETO.....	26
4.1.1	Desenho experimental	26
4.1.2	Construção de DNA codificando IL-7 canina	27
4.1.3	Subclonagem para o plasmídeo <i>pFastBac1</i>	27
4.1.4	Transposição de inserto para bacmídeo.....	28
4.1.4.1	Extração de bacmídeo.....	29
4.1.4.2	<i>Avaliação do tamanho do inserto de bacmídeo.....</i>	<i>30</i>
4.1.5	Manutenção de células de inseto	31
4.1.6	Obtenção de estoque viral	31
4.1.7	Ensaio de otimização da produção de proteína recombinante.....	33
4.1.7.1	<i>Dot blot.....</i>	<i>33</i>
4.1.8	Produção da proteína recombinante	34
4.1.9	Purificação de IL-7 canina recombinante por cromatografia de afinidade	34
4.1.10	SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	35
4.2	ENSAIO BIOLÓGICO DE <i>rcaIL-7</i> UTILIZANDO CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS	36
4.2.1	Desenho Experimental.....	36
4.2.2	Considerações éticas.....	37
4.2.3	Animais.....	38
4.2.4	Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) de cães	38

4.2.5	Ensaio de linfoproliferação.....	38
4.2.6	Análise de proliferação celular por Citometria de Fluxo	39
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5.	RESULTADOS	41
5.1	SUBCLONAGEM DA CONSTRUÇÃO DE DNA <i>GP64caIL-7</i> DO PLASMÍDEO <i>pUC57</i> PARA O PLASMÍDEO <i>pFastBac1</i>	41
5.2	TRANSPOSIÇÃO DO SEGMENTO DE DNA ENTRE <i>TN7L</i> E <i>TN7R</i> DA CONSTRUÇÃO PLASMIDEAL <i>pFastBac1-GP64caIL-7</i> PARA O CROMOSSOMA ARTIFICIAL DO BACULOVÍRUS	42
5.3	OBTENÇÃO DE ESTOQUE VIRAL PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	44
5.4	PRODUÇÃO DA <i>rcaIL-7</i>	44
5.4.1	Avaliação da produção e purificação da <i>rcaIL-7</i>	45
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE <i>rcaIL-7</i> PRODUZIDA EM CÉLULAS HIGH-FIVE INFECTADAS COM BACULOVÍRUS RECOMBINANTE.....	50
6.	DISCUSSÃO	54
7.	CONCLUSÃO	59
8.	PERSPECTIVAS	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE – ESBOÇO ARTIGO CIENTÍFICO	70

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No Brasil, a leishmaniose Visceral (LV), que é causada pelo protozoário *Leishmania chagasi*, sinônimo de *L. infantum*, afeta principalmente o homem e o cão doméstico, sendo esse último o principal reservatório do parasito (WHO, 2010).

A maioria dos seres humanos com LV que recebe o tratamento farmacológico específico desenvolve cura clínica (COOK et al., 1993) e tende a não exibir novo episódio da doença, quer devido à recaída ou a re-infecção. Por outro lado, a maioria dos cães que desenvolve a enfermidade e que é submetida à quimioterapia específica, embora revele desaparecimento das manifestações clínicas, redução da carga parasitária e passe exibir resposta linfoproliferativa específica após a estimulação *in vitro*, apresenta recaída após a interrupção do tratamento (BANETH; SHAW, 2002) mesmo na ausência de re-infecção (SLAPPENDEL; TESKE, 1997), e perde a capacidade de montar resposta imune celular específica (MORENO et al., 1999).

O processo de controle sobre a infecção por *Leishmania*, incluindo no cão, depende do estabelecimento de uma resposta imune celular, do tipo Th1 (PINELLI et al., 1994), e da geração de células Th1 de memória (KAYE et al., 2004). Existe a possibilidade de que a resposta imune específica apresentada por cães após o tratamento não seja suficientemente polarizada para Th1 ou que não envolva a indução e/ou manutenção de células T CD4 e/ou T CD8 de memória e, em consequência disso, os cães voltem a apresentar sintomatologias clínicas devido à recaída ou re-infecção.

As medidas de controle da LV preconizadas pelo Ministério da Saúde, são caras e laboriosas para serem mantidas de forma sistemática pelo Sistema de Saúde por um longo período que, provavelmente, se fará necessário para o alcance do controle dessa enfermidade. Uma alternativa para o controle da LV zoonótica, que afetaria a doença no homem e no cão, seria a utilização de uma vacina contra leishmaniose visceral canina (LVC) (TESH, 1995; DYE, 1996). Existem vários investigadores trabalhando no desenvolvimento de uma vacina (GHOSH et al., 2001; CABRERA et al., 2003; RAMIRO et al., 2003; GRADONI et al., 2005; FERNANDES et al., 2008), no entanto, até o momento não existe uma que tenha sido avaliada multicentricamente eficaz contra LVC.

Na literatura científica há estudos que descrevem a produção de proteínas recombinantes de interesse biotecnológico, biomédico e científico. Dentre essas estão as citocinas, proteínas que desempenham um papel importante na regulação e modulação da

resposta imune e são capazes de desencadear reações inflamatórias em resposta a estímulos ambientais, tais como infecções (VILCEK; FELDMANN, 2004). Nesse contexto, algumas citocinas apresentam um grande potencial de serem utilizadas como agente imunomodulador em algumas enfermidades, como por exemplo, na LVC. Dentre essas citocinas, podem-se destacar a IL-2 e a IL-12, as quais têm um importante papel no desenvolvimento de resposta imune celular do tipo Th1 (AFONSO et al., 1994, YAMAKAMI et al, 2001; KAUFMAN et al, 2002) e as citocinas IL-7 e IL-15, que são capazes de promover resposta imune de memória (LENZ et al., 2004; BRADLEY et al., 2005; SURH; SPRENT, 2008; KIM et al., 2008).

A IL-7 possui um papel importante no desenvolvimento da homeostase de células linfóides, podendo ser usada no processo de recuperação do sistema imunológico e/ou a otimização de terapias imunológicas, visto que essa citocina atua como fator de crescimento de células T, além de ser importante na manutenção de células de memória (ALPDOGAN; VAN DEN BRINK, 2005). Alguns autores relatam que IL-7 é capaz de promover a sobrevivência e a proliferação de linfócitos T de memória em seres humanos e/ou primatas não humanos (GEGINAT; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2001; LENZ et al., 2004; BRADLEY et al., 2005; CIERI et al., 2013).

Em nosso laboratório, inicialmente, a interleucina 7 recombinante canina (rcaIL-7) foi produzida em *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS na forma de corpúsculos de inclusão, necessitando, portanto, de uma etapa adicional de renaturação para a obtenção da citocina com a conformação nativa (PAIVA, 2011). Para a renaturação, corpúsculos de inclusão contendo rcaIL-7 foram solubilizados em um tampão com uréia a 8 M e, depois, a proteína foi dialisada contra uréia a 8 M e ditiotreitol a 5 mM. Em seguida, a rcaIL-7 solubilizada foi submetida a banhos de diálise usando-se tampão com concentração de uréia e ditiotreitol cada vez menor, seguindo-se o método descrito por Guisez e colaboradores, 1993. Embora a rcaIL-7 produzida em *E. coli* e renaturada tenha apresentado atividade biológica, sendo capaz de promover a proliferação de linfócitos de sangue periférico de cão, o rendimento do processo de renaturação foi muito baixo, gerando apenas unidades de microgramas da proteína por litro de cultura de bactéria (PAIVA, 2011). Como o rendimento foi baixo, posteriormente, a renaturação rcaIL-7 foi tentada pelo método de diluição (PAIXÃO, 2014), conforme método descrito por Ouellette e colaboradores, 2003. Para isso, a rcaIL-7 solubilizada em tampão Tris-HCl com uréia a 6 M foi adicionada lentamente em um tampão de renaturação (100 mM Tris; 2 mM EDTA; 500 mM Arginina; pH 7,4 e 0,55g/L Glutathiona Oxidada) e, depois,

mantida por 72 horas no mesmo tampão, sendo finalmente dialisada contra PBS ou solução tamponada com Tris. Esse protocolo de renaturação também apresentou um baixo rendimento. Uma possibilidade para explicar a dificuldade de renaturar a maior parte das moléculas seria a não formação de pontes de dissulfeto da proteína purificada pelos métodos usados. A IL-7 canina, provavelmente, exibe 3 pontes de dissulfeto (COSENZA et al., 1997). Por isso, uma tentativa de produzir a rcaIL-7 com a conformação nativa foi realizada usando-se uma linhagem de *E. coli* (SHuffle T7 Express *LysY*), que favorece a formação de pontes de dissulfeto por exibir a deleção dos genes das enzimas glutaredoxina redutase (Δ gor) e tioredoxina redutase (Δ trxB) e expressar de forma transgênica a enzima isomerase de ponte de dissulfeto (isomerase DsbC). Experimentos foram realizados com *E. coli* (SHuffle T7 Express *LysY*) transformadas com a construção plasmideal *pRSET-caIL-7* cultivada a 16 ou 30 °C, contudo, infelizmente, a rcaIL-7 continuou sendo produzida na forma de corpúsculos de inclusão.

Para superar a dificuldade de produzir rcaIL-7 com a conformação nativa, resolveu-se avaliar um sistema eucarioto de produção de proteínas heterólogas. Dentre esses, o sistema baculovírus-células de inseto tem-se mostrado muito promissor. Os baculovírus (família *Baculoviridae*) pertencem a um grupo diverso de vírus com DNA dupla fita que infectam naturalmente insetos, especialmente lepidópteros. Vários autores vêm usando a décadas duas linhagens de células de mariposa das espécies *Spodoptera frugiperda* (Sf9) e *Trichoplusia ni* (BTI-TN5B1-4 ou High-Five) para produzir proteínas recombinantes com construções de baculovírus. A linhagem de células Sf9 foi originalmente obtida a partir de células de ovário de lagartas da espécie *S. frugiperda* (lagarta do cartucho do milho) e as células High-Five foram isoladas de ovos da espécie *T. ni*. (GRANADOS et al., 2007).

Diversos trabalhos têm demonstrado a produção de proteínas recombinantes na forma nativa em células da linhagem Sf9 (CHA et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2007; TSCHANTZ, et al., 2008) e High-five (WANG et al. 2008; QIU et al., 2009). Alguns autores relataram que o rendimento de proteínas secretadas é maior na linhagem de células High-five, em comparação com células Sf9 (DAVIS et al., 1993). Por isso, neste trabalho, optou-se por utilizar células da linhagem High-five para a produção da rcaIL-7.

Devido ao fato da IL-7, usada isoladamente ou em combinação com outras citocinas, exibir o potencial de promover desvio da resposta imune para Th1 e geração de células de memória (LENZ et al., 2004), e como não existem dados disponíveis na

literatura quanto as condições de uso dessa citocina no cão, estudos necessitam ser realizados para determinação de doses que sejam capazes de induzir um efeito biológico sem causar toxicidade nesses animais.

Visando avaliar, em um futuro próximo, os efeitos imunomoduladores de IL-7 canina sobre a leishmaniose visceral canina, no presente trabalho, foram propostas a produção e purificação da rcaIL-7 e a avaliação do seu efeito biológico em células mononucleares de cães saudáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTERLEUCINA-7

2.1.1 Características gerais

Citocinas são proteínas com importante papel na imunidade inata e adquirida em resposta a microrganismos e outros antígenos e são secretadas por diferentes tipos celulares. Definidas como agentes modificadores de respostas biológicas, as citocinas na clínica estão sendo avaliadas ou podem ser utilizadas como agentes terapêuticos e como alvos para antagonistas específicos em numerosas doenças imunológicas e inflamatórias (ABBAS et al., 2008; HUANG et al., 2010).

A interleucina 7 (IL-7) é uma glicoproteína essencial para o desenvolvimento e sobrevivência de linfócitos. Descoberta em 1988 como um fator hematopoiético que promovia a proliferação de células progenitoras da linhagem linfocitária B em um sistema de cultura de medula óssea, a IL-7, ficou conhecida como linfopoiética-1 (NAMEN et al., 1988). Logo depois, estudos mostraram que a IL-7, tanto em seres humanos quanto em camundongos, age como um coestimulador de células T imaturas e maduras (MORRISSEY et al., 1989). Trata-se de uma citocina do tipo 1, de cadeia curta da família das hematopietinas, grupo que também inclui a IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15, (revisado por FRY; MACKALL, 2002).

A IL-7 é secretada por células do estroma da medula óssea, bem como células epiteliais tímicas e intestinais (SAKATA et al., 1990; MAZZUCHELLI; DURUM, 2007). Além disso, algumas células mononucleares, incluindo as células dendríticas e os macrófagos também produzem IL-7 (JIANG et al., 2005). A IL-7 promove a proliferação e a diferenciação de células da linhagem T e B no timo e na medula óssea, respectivamente (WEI et al., 2000). A IL-7 não tem apenas um papel importante na linfopoiese e manutenção das células T e B, mas também na sobrevivência e diferenciação de outras linhagens celulares, tais como células apresentadoras de antígenos (APCs). Para APCs humanas, a IL-7 atua no desenvolvimento de células dendríticas linfóides no timo (VARAS, et al., 1998) e na diferenciação de células dendríticas imaturas de precursores mielóides (TAKAHASHI et al., 1997).

Os efeitos da IL-7 são mediados através do seu receptor (IL-7R). O receptor para IL-7 é um complexo dimérico que inclui, duas subunidades: a cadeia α IL-7R (IL-7R α),

também conhecida como CD127, e a cadeia γ comum IL-7R (IL-7R γ), também denominada de CD132 (SUDO et al.; 1993; SCHLUNS; LEFRANÇOIS, 2003; MAZZUCHELLI; DURUM, 2007), a qual também é partilhado por outros receptores de citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21 (BOYMAN et al., 2007). O receptor de IL-7 (IL-7R) é expresso em progenitores de células B, mas não é detectado em linhagem de células B maduras. Também é expresso em populações de timócitos em camundongos, nas células T maduras e em macrófagos derivados de medula óssea (PARK et al., 1990; ALPDOGAN; VAN DEN BRINK, 2005).

2.1.2 Papel biológico

A primeira evidência de que a citocina IL-7 tem papel na linfopoiese veio a partir da utilização de anticorpos anti-IL-7 em camundongos, levando a interrupção no desenvolvimento de células T e B (GRABSTEIN et al., 1993). Estudos têm sugerido que as interações impedindo a ligação de IL-7 e seu receptor podem interferir na homeostase/manutenção da célula T em órgãos linfóides periféricos, mostrando efeito sobre a imunidade adaptativa (HOFMEISTER et al., 1999; LEE; SURH, 2005).

Além disso, camundongos deficientes para a IL-7 ou IL-7R α exibem grave hipoplasia linfóide, incluindo escassez na produção de células B, assim como prejuízo no desenvolvimento de células T no timo, demonstrando sua importância não só para a homeostase destas células, mas também para o desenvolvimento das mesmas (VON FREEDEN-JEFFRY et al., 1995; PESCHON et al., 1994).

Em um estudo realizado por Morrissey e colaboradores (1989), a administração de IL-7 em camundongos normais estimulou a linfopoiese de células B no baço, nódulos linfáticos e medula óssea. Entretanto, ao contrário do que se observou em camundongos, pacientes com imunodeficiência combinada severa (SCID) que possuem uma mutação na cadeia de IL-7R α apresentam um bloqueio da linfopoiese de célula T, mas não no desenvolvimento de células B, indicando que a IL-7 não é essencial para o desenvolvimento de células B em humanos (PUEL et al., 1998; SCHLUNS; LEFRANÇOIS, 2003).

Um estudo realizado por Rathmell e colaboradores (2001) mostrou que células T maduras e *naïve* cultivadas na ausência de IL-7 exibem um tamanho celular pequeno, baixo metabolismo de glicólise e resposta retardada a estímulos mitogênicos. Vivien e colaboradores (2001), demonstraram um papel importante da IL-7 na sobrevivência do

compartimento de células T *naïve*, especialmente de células T CD4+. Essas células, curiosamente, expressam níveis mais elevados de IL-7R α do que as células T CD8+ e parecem ser mais dependentes de sinalização derivada de IL-7 para sobrevivência. Após ativação através de TCR (receptores de células T) a expressão de IL-7R α na maioria das células T CD8+ inexperientes é reduzida e esta expressão estar correlacionada com a habilidade de algumas células T CD8+ efetoras tornarem-se células de memória (SCHLUNS et al., 2000; KAECH et al., 2003).

Segundo Moniuszko e colaboradores (2004), em um estudo realizado em macacos rhesus sadios, doses de IL-7 promoveram o aumento no número de linfócitos T de memória central, *naïve* e efetores, levando à conversão de células *naïve* para células com fenótipo de memória. A administração de IL-7 em macacos infectados com vírus da imunodeficiência símia (SIV) ou sadios aumentou o número de células T na periferia, tanto CD4+ quanto CD8+. Curiosamente, a administração de IL-7 em primatas teve efeitos menos proeminentes sobre linfopoiese de células-B, em comparação com roedores. Além disso, a administração de IL-7 em macacos infectados com SIV ou receptores de um transplante autólogo de medula óssea teve efeitos mais fortes sobre a expansão de células T periféricas do que na timopoiese (FRY et al., 2003; STOREK et al., 2003).

Portanto, por ser uma citocina envolvida na regulação de hematopoiese, que atua principalmente sobre compartimento de célula linfóide (HENNEY, 1989), a IL-7 é capaz de estimular sinalização para sobrevivência de células T CD4+ e CD8+ ativadas além de participar na diferenciação de células T de memória in vivo por ligação à IL-7R α sobre estas células (MA et al., 2006).

2.1.3 Aplicação terapêutica

O uso dessa citocina vem recebendo a atenção de muitos pesquisadores que passaram a avaliar experimentalmente o uso de IL-7 em diversas condições, como por exemplo, no controle de neoplasias, na reconstituição de células T necessária após quimioterapia e radioterapia (WILLIAMS et al., 2007), na promoção de respostas imunes no curso de doenças infecciosas, na geração de resposta imune de maior intensidade e de longa duração, como agente adjuvante (COLPITTS et al., 2009; NANJAPPA et al., 2008) ou como agente imunoterápico (MAEURER et al., 2000; PELLEGRINI; MAK, 2010).

Em camundongos, a terapia com IL-7 promove um aumento nas funções das células dendríticas (FRY et al., 2001). A administração de IL-7 promoveu a redução do número de metástases e o aumento da resposta de células T em camundongos inoculados com uma linhagem de células de carcinoma renal (KOMSCHLIES et al., 1994). Em seres humanos que exibiam câncer refratário ao tratamento convencional, a administração de IL-7 recombinante resultou em uma expansão policlonal prolongada de células T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico. Tal efeito decorrente do aumento da proliferação de células T e da sobrevivência poderia resultar na melhoria da função imune em pacientes com imunidade comprometida (SPORTÈS et al., 2008).

Em um estudo de fase I, Sereti e colaboradores (2009) avaliaram as propriedades biológicas e segurança farmacológica da IL-7 recombinante humana (rhIL-7) em pacientes infectados pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana). Uma única dose de rhIL-7 é bem tolerada, variando de 3 a 60 µg/kg, e segundo os autores tende a promover um aumento do número de células T CD4+ e CD8+ circulantes, predominantemente do fenótipo de memória central.

Em outro estudo de fase I, Sportès e colaboradores (2010) avaliaram a toxicidade dose-limitante e a segurança farmacológica de IL-7 em pacientes com doenças neoplásicas. Nesse estudo, os autores utilizaram doses de rhIL-7 variando de 3 a 60 µg/kg, e observaram aumento de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ periféricos, mostrando ser um efeito dose-dependente e independente de idade em todos os indivíduos que receberam ≥ 10 ug / kg /dose, o que resulta em um perfil de células T circulantes rejuvenescido.

Lévy e colaboradores (2012), em um estudo de fase I/IIa, avaliaram os mecanismos de restauração de células T com terapia rhIL-7 em pacientes infectados pelo HIV recebendo terapia anti-retroviral. Os autores utilizaram doses de rhIL-7, de 10, 20 e 30 µg/kg e parâmetros como toxicidade, atividade e o impacto da rhIL-7 na reconstituição imunológica foram monitorados. Nesse estudo foi observado que doses de rhIL-7 de até 20 ug/kg foram bem toleradas, e que a rhIL-7 aumentou predominantemente o número de células T CD4+ de memória central e *naïve* e subpopulações de células T CD8+.

2.2 LEISHMANIOSE VISCERAL (LV)

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecto-parasitária sistêmica que acomete cães e outros mamíferos vertebrados. É causada por protozoários intracelulares viscerotrópicos pertencentes ao gênero *Leishmania* e a transmissão ocorre, de um indivíduo para outro, pela picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae* e sub-família *Phebotominae*, conhecidos comumente como flebotomíneos, sendo *Lutzomyia longipalpis* a espécie responsável pela transmissão da *Leishmania chagasi* no Brasil (BEERS & BERKOW, 1999; LAINSON et al., 1977).

As espécies *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*, formam o complexo donovani e são as que, mais freqüentemente, causam a doença (LAINSON et al., 1987; MURRAY et al., 2005). Alguns autores, baseados em semelhanças genéticas, 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 *Leishmania donovani* causa uma antroponose distribuída principalmente no Sudão, Bangladesh, Índia e Nepal, cujo principal reservatório é o homem enquanto que a *Leishmania infantum*, ou *Leishmania chagasi*, causa uma zoonose que afeta principalmente a Bacia Mediterrânea, a região central e o sudoeste da Ásia, além da América do Sul, onde o cão é tido como principal reservatório da infecção (DESJEUX, 2001).

No Brasil, em ambiente silvestre, uma espécie de marsupial *Didelphis marsupialis* e duas espécies de raposa, a *Lycalopex ventulus* e *Cerdocyon thous*, são apontadas como reservatórios do parasito além do cão (PARANHOS-SILVA et al., 1996; CABRERA et al., 2003).

As leishmanioses são doenças que demandam de investimento de saúde pública, sendo considerada uma das seis doenças infecto-parasitárias de maior importância devido à ampla distribuição, grande incidência, gravidade da doença e alta taxa de ocorrência em regiões pobres. Esta zoonose apresenta altos níveis de morbidade e mortalidade nos trópicos e subtropicais com notificações de endemia em 98 países (ALVAR et al., 2012). Apesar de serem declarados oficialmente somente 600.000 novos casos por ano, concentrados principalmente na Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão e Brasil, estima-se que esse número na realidade alcance 2 milhões de pessoas e que cerca de 350 milhões vivam em áreas endêmicas (DESJEUX, 2004; WHO, 2010).

Aproximadamente 90% dos casos de LV registrados na América do Sul ocorrem no Brasil (ALBUQUERQUE et al., 2009). No passado, a doença era considerada tipicamente rural, no entanto, o número de casos vem aumentando em áreas urbanas de médio e grande porte em muitas cidades do país (JERONIMO et al., 1994; CORREA ANTONIALLI et al., 2007). Na década de 90, a maior incidência da doença ocorria na região nordeste com mais de 90% dos casos relatados, distribuídos principalmente nos estados do Ceará, Bahia, Piauí e Maranhão. No entanto, novos casos já foram observados nas regiões sudeste e sul, devido à expansão da doença e o percentual de LV notificados no Brasil tem diminuído para 66% (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

As medidas preconizadas pelo Ministério da Saúde para o controle da LV no Brasil consistem: do tratamento de casos da doença humanos; do controle do inseto vetor; da identificação e eliminação de cães infectados e de atividades educativas (BRASIL, 2009). Muitas vezes, o sacrifício de cães infectados não é aceito pela comunidade, em áreas endêmicas, muito provavelmente pelo fato de parte dos cães que apresentam resultado positivo no ensaio imunofluorescência indireta (IFAT) não exibirem manifestações clínicas.

Uma estratégia alternativa para o controle da LV consiste no uso de uma vacina e/ ou método imunoterápico eficaz capaz de impedir a infecção/doença/infectividade no cão (TESH, 1995), ainda indisponíveis. Apesar de duas diferentes vacinas já terem sido licenciadas no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Ministério da Saúde (MS) não recomenda o uso de tais vacinas para o controle da LV, pois ainda não existem evidências, obtidas de um modo independente, indicando a eficácia das mesmas.

Os casos humanos que foram tratados com fármacos específicos, como antimonial pentavalente ou anfotericina B, desenvolvem a capacidade de controlar a infecção (COOK et al., 1993) e tendem a não desenvolver novo episódio da doença, quer devido à recaída ou à re-infecção. Os cães, no entanto, quando desenvolvem a enfermidade e são submetidos à quimioterapia específica (antimonial pentavalente, anfotericina B ou pentamidina), apresentam cura clínica apenas transitória. Após a interrupção do tratamento, a maioria dos cães apresenta recaída (MORENO et al., 1999; BANETH; SHAW, 2002).

Considera-se que o controle sobre a infecção por *Leishmania* no cão dependa do desenvolvimento de uma resposta imune celular específica do tipo Th1 (PINELLI et al., 1995; RHALEM et al., 1999), e da geração de células Th1 de memória (KAYE et al.,

2004). Acredita-se que os cães voltam a desenvolver manifestações clínicas, devido à recaída ou reinfecção, pelo fato da resposta imune específica apresentada não ser adequadamente polarizada para Th1 após o tratamento ou por que não causa a indução e/ou manutenção de células T CD4 e/ou T CD8 de memória. Considerando que a IL-7 é uma citocina capaz de promover a resposta imune de memória (LENZ et al., 2004; BRADLEY et al., 2005; SURH; SPRENT, 2008), é interessante avaliar se a mesma promove a expansão de células imune de memória (linfócitos T CD4, CD8) gerando assim um estado de resistência duradouro, ou no tratamento e/ou vacina contra LVC.

Até o presente momento, ainda não foram descritas na literatura científica a produção, a avaliação de atividades biológicas, a utilidade na modulação da resposta imune ou a geração de células de memória da citocina IL-7 canina.

Visando a avaliação, em um futuro próximo, da utilidade de IL-7 canina em um método imunoterápico para LV canina, no presente trabalho foram descritas a obtenção da construção de DNA codificante, a subclonagem, a produção e a purificação, bem como a avaliação da atividade biológica da IL-7 canina.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e purificar a citocina IL-7 recombinante canina (rcaIL-7) biologicamente ativa visando estudos de imunomodulação em cães.

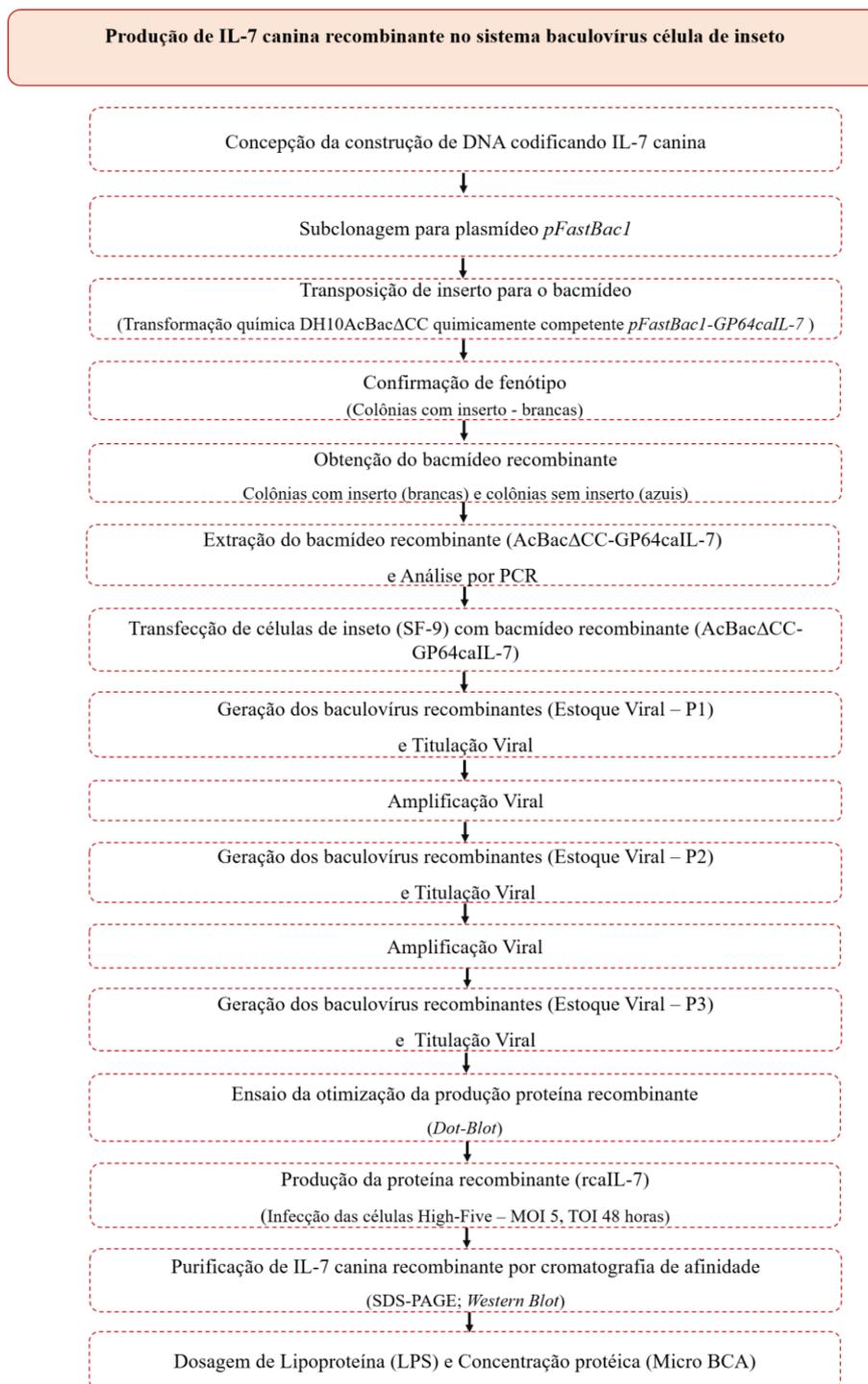
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Obter baculovírus recombinante contendo segmento de DNA da construção plasmideal carreadora *pFastBac1-GP64caIL-7*;
- 3.2.2 Produzir e purificar a proteína IL-7 recombinante canina;
- 3.2.3 Avaliar a atividade biológica da IL-7 recombinante canina produzida no sistema baculovírus-células de inseto.

4. METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO DE IL-7 CANINA RECOMBINANTE NO SISTEMA-BACULOVÍRUS CÉLULA DE INSETO

4.1.1 Desenho experimental



4.1.2 Construção de DNA codificando IL-7 canina

Previamente, em nosso laboratório, uma construção de DNA foi concebida para a produção da IL-7 canina na forma secretada no sistema baculovírus-células de inseto. A construção foi concebida de modo a codificar da extremidade 5' para a 3': a) a sequência líder da proteína GP64 (sinônimo de gp67) do vírus da polihedrose nuclear múltipla da *Autografa californica* (AcMNPV) (WHITFORD et al., 1989), b) a IL-7 canina (proteína madura) (Genebank, número de acesso DQ845341), c) um espaçador de 23 aminoácidos, e d) uma cauda de seis histidinas (Figura 1). Na extremidade 5' foi adicionado um sítio de restrição para a endonuclease *SalI* e na extremidade 3' foram acrescentados um sítio de restrição para a endonuclease *NotI* e dois códons de parada. A construção de DNA foi elaborada com códons otimizados para os elementos “a” (a partir do terceiro códon), “b”, “c” e “d” para a tradução em *Trichoplusia ni*, sintetizada quimicamente e subclonada no plasmídeo *pUC57* pela empresa GenScript (Piscataway, EUA), dando origem a construção plasmideal denominada *pUC57-GP64caIL-7*.

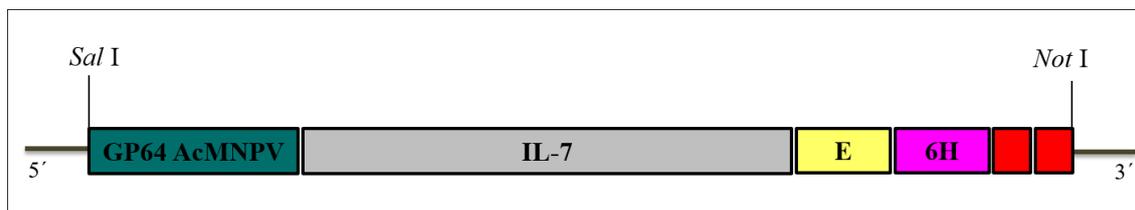


Figura 1. Desenho esquemático da construção de DNA usada para a produção de IL-7 canina no sistema baculovírus células de inseto. A construção de DNA foi concebida com os seguintes elementos na orientação 5'-3': um sítio de restrição para endonuclease *SalI* e uma série de nucleotídeos que codificam a sequência líder da proteína GP64 do AcMNPV, a IL-7 canina (proteína madura), um espaçador com 23 aminoácidos, uma cauda de seis histidinas, um sítio de restrição para endonuclease *NotI*, e dois códons de parada.

4.1.3 Subclonagem para o plasmídeo *pFastBac1*

Em nosso laboratório, foi realizada a subclonagem do inserto *GP64caIL-7* da construção plasmideal *pUC57-GP64caIL-7* para o plasmídeo *pFastBac1* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Para isso, foi realizada a digestão da construção plasmideal *pUC57-GP64caIL-7* e do plasmídeo *pFastBac1* com as endonucleases de restrição *SalI* e *NotI* (Thermo Fisher Scientific, Boston, EUA), purificação dos fragmentos de DNA em gel de agarose e ligação do inserto *GP64caIL-7* ao plasmídeo *pFastBac1* duplamente digerido com a T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific) (Cristiane G. M. Pinheiro, dados não

publicados), obtendo-se a construção *pFastBac1-GP64caIL-7* (Figura 2). Para confirmar o sucesso da subclonagem, amostras da construção *pFastBac1-GP64caIL-7* foram submetidas à digestão pelas enzimas *SalI* e *NotI* (Thermo Fisher Scientific) e análise em gel de agarose corado com brometo de etídio, seguindo-se um método convencional (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

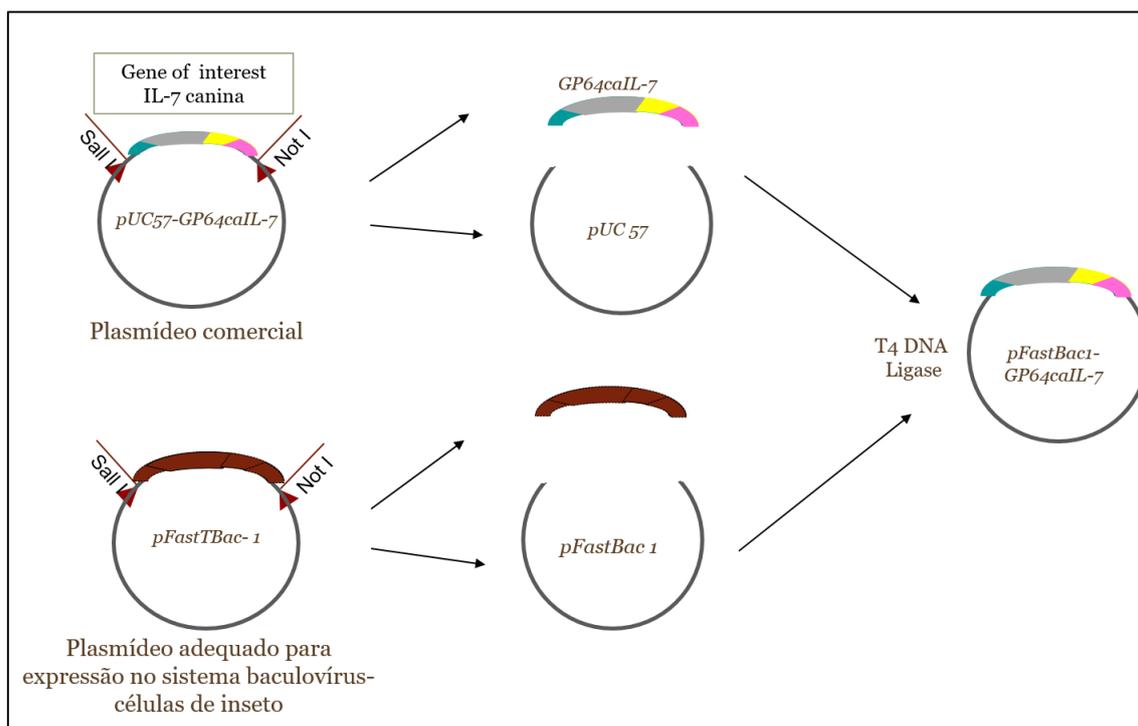


Figura 2. Ilustração da subclonagem do inserto *GP64caIL-7* da construção plasmídeo *pUC57-GP64caIL-7* para o plasmídeo *pFastBac1*. A construção plasmídeo *pUC57-GP64caIL-7* e o plasmídeo *pFastBac1* foram digeridos por endonucleases de restrição (*SalI* e *NotI*) e os fragmentos de DNA correspondentes a *GP64caIL-7* e ao plasmídeo desprovido de segmento de DNA do sítio múltiplo de clonagem foram ligados (*T4 DNA Ligase*), dando origem a construção *pFastBac1-GP64caIL-7*.

4.1.4 Transposição de inserto para bacmídeo

A transposição do inserto da construção plasmídeo *pFastBac1-GP64caIL-7* para o bacmídeo (cromossoma artificial do baculovírus que contém elementos do plasmídeo mini-F) foi realizada pela transformação de bactéria *Escherichia coli* da cepa DH10AcBac Δ CC (gentilmente doada pela Dra. Monique M. van Oers, Laboratório de Virologia, Universidade de Wageningen, Holanda), conforme método descrito por Luckow e colaboradores, 1993. A cepa DH10AcBac Δ CC contém um bacmídeo do AcMNPV [deficiente nos genes da catepsina (*cath*) e da quitinase (*chi*)] e um plasmídeo auxiliar que codifica uma transposase (KABA et al., 2004). Resumidamente, uma alíquota de 100 μ L de *E. coli* da cepa DH10AcBac Δ CC quimicamente competente foi

misturada com um 1 μ L de uma mini-preparação da construção plasmídeoal *pFastBac1-GP64caIL-7*. *E. coli* competente e a mini-preparação de plasmídeo foram obtidas pelo tratamento com CaCl_2 e por lise alcalina, respectivamente, usando-se métodos convencionais (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Em um tubo Eppendorf, a mistura foi incubada sob gelo por 30 minutos e, posteriormente, as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 45 segundos. Em seguida, tubo foi incubado sob gelo por 2 minutos. Novecentos μ L de meio SOC (triptona a 2%, extrato de levedura a 0,5%, NaCl a 10 mM, KCl a 2,5 mM, MgCl_2 a 10 mM, MgSO_4 a 10 mM e glicose a 20 mM) foram adicionados ao tubo Eppendorf e, depois, o tubo foi incubado a 37 °C por 4 horas sob agitação constante em uma agitadora de tubos (News Brunswick Scientific, Edison, EUA), para recuperação das células transformadas. Um volume de 150 μ L da suspensão bacteriana foi semeada em uma placa de petri com meio sólido de cultura Luria-Bertani (LB) contendo 1,5 % de ágar (m/v), kanamicina (50 μ g/mL), gentamicina (7 μ g/mL), tetraciclina (10 μ g/mL), isopropil-tio-galactosídeo (IPTG, a 40 μ g/mL) e X-gal a (100 μ g/mL) (LB ágar-kan-gen-tet-IPTG-X-gal). A placa de petri foi incubada por 48 horas a 37 °C. Para obtenção de bacmídeo controle negativo, uma alíquota de 100 μ L de *E. coli* da cepa DH10AcBac Δ CC quimicamente competente foi transformada com o plasmídeo *pFastBac1* vazio, conforme o método descrito acima. Uma amostra de uma colônia de cor branca de *E. coli* transformada com *pFastBac1-GP64caIL-7* ou *pFastBac1* vazio, que representa clones nos quais houve transposição do inserto entre as regiões *Tn7L* e *Tn7R* do plasmídeo para o bacmídeo, foi semeada em uma nova placa de petri com de meio de cultura LB ágar-kan-tet-gen-IPTG-X-gal. As placas de petri foram incubadas por 48 horas a 37 °C, para confirmar o fenótipo das colônias brancas. Uma amostra de uma colônia de cor azul, que representa clones nos quais não houve transposição de inserto, foi utilizada como controle positivo de ensaio.

4.1.4.1 Extração de bacmídeo

Uma amostra de colônia de *E. coli* da cepa DH10AcBac Δ CC transformada com *pFastBac1-GP64caIL-7* ou do plasmídeo *pFastBac1* vazio, que apresentavam cor branca com fenótipo confirmado, foi usada para inocular 5 mL de meio de cultura LB contendo kanamicina (50 μ g/mL), gentamicina (7 μ g/mL) e tetraciclina (10 μ g/mL) em um tubo de ensaio de 15 mL. Os tubos de ensaio foram incubados por 16 a 18 horas a 37°C, sob agitação. Amostras de 1,5 mL foram transferidas para tubos Eppendorf e foram

centrifugadas a 14.000 x g em microcentrífuga (Eppendorf, Nova Iorque, EUA) por 45 segundos, a 4 °C. Os sobrenadantes resultantes foram removidos e cada sedimento bacteriano foi ressuspensão com 0,3 mL de solução I (15 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RNase 100 µg/mL, pH 8,0) utilizando-se um aparelho vórtex (Labnet, Carlsbad, EUA). Em seguida 0,3 mL de solução II (0,2 N NaOH, 1% duodecil-sulfato de sódio - SDS) foram adicionados a cada tubo Eppendorf e as suspensões foram misturadas, gentilmente, por inversão dos tubos por 4 ou 5 vezes. Após esse procedimento, 0,3 mL de solução III (gelada) (acetato de potássio a 3 M, pH 5,5) foram adicionados a cada tubo. O conteúdo de cada tubo foi misturado por inversão e os tubos foram incubados sob gelo por 10 minutos, para neutralização do pH e solubilização de DNA de bacmídeo. Os tubos foram centrifugados a 14.000 x g por 10 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos Eppendorf e DNA de bacmídeo foi precipitado pela adição de 0,8 mL de isopropanol por tubo, incubação sob gelo por 10 minutos e centrifugação a 14.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e a cada tubo foram acrescentados 0,5 mL de etanol a 70% (gelado). Os tubos foram centrifugados a 14.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram removidos e os tubos foram deixados a temperatura ambiente para evaporação de etanol por cerca de 10 minutos. Depois disso, cada sedimento de DNA de bacmídeo foi ressuspensão com 40 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). Os tubos foram armazenados -20 °C para estoque prolongado, até o momento do uso.

4.1.4.2 Avaliação do tamanho do inserto de bacmídeo

A avaliação do tamanho de inserto no bacmídeo recombinante (AcBac Δ CC-GP64*caIL-7*) ou no bacmídeo controle negativo (AcBac Δ CC-pFasBac1) foi feita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC e 5'-CAGGAAACAGCTATGAC. As reações de PCR foram realizadas em um volume 50 µL. Para isso, em cada tubo, foram adicionados 1,5 µL de MgCl₂ a 50 mM, 1 µL de dNTPs a 10 mM, 0,5 µL de DNA polimerase a 5 U/µL [Thermus aquaticus (Taq) DNA polimerase, Thermo Fisher Scientific], 5 µL de tampão da Taq DNA polimerase concentrado 10 vezes (Thermo Fisher Scientific), 1,25 µL de cada oligonucleotídeos iniciador a 10 µM (Invitrogen), 1 µL da mini-preparação de DNA de bacmídeo e água milli-Q autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 50 µL. Uma etapa inicial de desnaturação de DNA foi

feita pelo aquecimento a 94 °C por 3 minutos. Depois disso, a reação foi realizada com 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 5 minutos, seguidos de um ciclo a 72 °C por 7 minutos, em termociclador (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Após a PCR, uma amostra de 1 µL de cada produto foi analisada por eletroforese em gel de agarose (Amersham Biosciences, Uppsalla, Suécia). Para isso, foi usado um gel de agarose a 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 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) e brometo de etídio a 0,5 µL/mL (Sigma-Aldrich). A corrida foi realizada a 80 mA por 1 h. O gel foi fotografado usando-se um fotodocumentador (Gel Doc XR, Bio-Rad, Hercules, EUA) através do *Software* Quantity One, versão 4.5.2 (Bio Rad).

4.1.5 Manutenção de células de inseto

Células do inseto das linhagens de Sf9 (derivadas da *Spodoptera frugiperda*, Invitrogen) e BTI-TN-5B1-4 (derivadas da *Trichoplusia ni* e comercializadas sob o nome de High-five, Invitrogen) foram utilizadas no presente trabalho. As células foram cultivadas conforme as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células Sf9 foram cultivadas em meio de cultura TNM-FH (Sigma-Aldrich) com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen), 10 µg/mL de sulfato de gentamicina (TNM-FH completo) (Sigma-Aldrich) com (cultivo de células em suspensão) ou sem (cultivo de células aderentes) Pluronic F-68 a 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich). As células High-five foram cultivadas em meio Express-five sem soro bovino fetal (SFM) (Invitrogen), suplementado com 18 mM de L-glutamina (Invitrogen) e 10 µg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich). As células Sf9 e High-five foram cultivadas em monocamadas, em frascos plásticos de 25 cm², ou em suspensão, em frascos Erlenmeyer com agitação de 100 a 120 rotações por minuto (rpm), sendo passadas cada 2 ou 3 dias na fase logarítmica de crescimento.

4.1.6 Obtenção de estoque viral

Amostras de bacmídeo contendo a construção *GP64-calL-7* ou segmento de DNA do *pFastBac1* vazio foram usadas para transfectar células Sf9 (Invitrogen) cultivadas em monocamada, utilizando-se lipofectamina, conforme as recomendações do fabricante (Invitrogen). Resumidamente, em placas de 6 poços (Costar Corning, Nova York, EUA),

foram colocadas 9×10^5 de células/poço em um volume de 2 mL de meio de TNM-FH (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen) e 10 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (TNM-FH suplementado). As placas de 6 poços foram incubadas por 1 hora e, depois disso, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas uma vez com 2 mL de TNM-FH. Em seguida, 1 mL de uma suspensão contendo bacmídeo, lipofectamina e meio TNM-FH foi adicionada em cada poço. Para a preparação da suspensão, em um tubo rotulado como “A”, foram colocados 5 μL de mini-preparação do bacmídeo *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* ou *AcBac Δ CC-pFastBac1* e 100 μL do meio TNM-FH. Em um tubo rotulado como “B”, foram colocados 8 μL de lipofectamina (Invitrogen) e 100 μL do meio TNM-FH. O conteúdo dos tubos “A” e “B” foi misturado e a mistura foi incubada por 15 minutos, a temperatura ambiente, para formação de complexos DNA/lipossoma. À mistura, foram adicionados 800 μL de do meio TNM-FH. As placas foram incubadas a 27 °C, por 5 horas na estufa B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio), e após esse período de incubação, o sobrenadante de cada poço foi removido e substituído por 2 mL de meio TNM-FH completo. As placas foram incubadas por 6 dias, a 27 °C, em câmara úmida. O sobrenadante de cada poço foi coletado e centrifugado a 500 x g por 5 minutos a 4 °C e os sobrenadantes resultantes (estoques virais da primeira passagem denominados P1) foram armazenados a 4 °C, protegidos da luz.

O título viral do estoque de P1 foi determinado por diluição limitante conforme método previamente descrito (O'REILLY et al., 1994). Resumidamente, em placas de microtitulação de 96 poços (Costar Corning), foram colocadas 10.000 células Sf9/poço em um volume de 90 μL /poço. Em seguida, foi feita uma diluição seriada do baculovírus de 10^{-1} a 10^{-9} , sendo aplicados 10 μL do meio TNM-FH completo ou de 10 μL de cada estoque viral P1 nas diluições a 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , 10^{-9} em TNM-FH completo a uma fileira de 12 poços da placa de microtitulação. As placas foram incubadas em câmara úmida a 27 °C por 7 dias. Depois desse período, as células de cada poço foram examinadas para sinais de infecção viral. Os sinais de infecção viral que incluem a parada de proliferação celular, aumento do tamanho de células, aumento do tamanho do núcleo e presença de um halo em torno do núcleo e lise celular. Considerando as duas fileiras com a maior diluição do estoque viral que apresentaram mais de 50 % e menos que 50 % dos poços com sinais de infecção viral e a distribuição de Poisson, foi determinado o título viral (TCID_{50} , O'REILLY et al., 1994).

A amplificação do estoque viral (obtenção de estoque da segunda e terceira passagem, respectivamente P2 e P3) foi realizada usando células Sf9 cultivadas em

suspensão. Para isso, suspensão de células na concentração de 2×10^6 /mL foi inoculada com 0,1 partículas virais por célula (multiplicidade de infecção-MOI) de estoque viral P1 para gerar P2 e de estoque viral P2 para gerar P3. Suspensão de células com volume de 100 mL foi usada para a obtenção de estoque viral P2 e P3 de *AcBac Δ CC-GP64caIL-7*. Três dias após a inoculação, quando a viabilidade celular encontrava-se em torno de 75 %, cada a suspensão celular foi centrifugada a $130 \times g$ por 5 minutos a 4 °C, e cada sobrenadante foi armazenado a 4 °C, protegido da luz. A titulação dos estoques P2 e P3 foi realizada conforme método descrito anteriormente.

4.1.7 Ensaio de otimização da produção de proteína recombinante

O ensaio de otimização da produção de rcaIL-7 na forma secretada foi realizado em células High-five cultivadas em meio Express Five SFM (Invitrogen). Para isso, em placas de 6 poços, foram colocadas 1×10^6 /poço em um volume de 2 mL/poço. Poços foram inoculados com vírus *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* usando-se MOI de 2, 5 ou 10 e com vírus *AcBac Δ CC-pFastBac1* utilizando-se MOI 10. As placas foram incubadas durante 1 hora, à 27 °C. Em seguida, os sobrenadantes de cultura foram removidos e foram adicionados 2 mL de meio de cultura, para remoção do soro bovino fetal presente nos estoques virais. As placas foram incubadas por 24, 48 ou 72 horas em câmara úmida a 27 °C. Os sobrenadantes foram coletados e centrifugados a $200 \times g$, por 5 minutos, a 4 °C. As células de cada poço foram coletadas em 1 mL de solução salina tamponada (PBS, 80 mM Na₂HPO₄, 30 mM KCl, 1,5 M NaCl, pH 7,4). Os sobrenadantes e resultantes e as células em PBS foram armazenados em tubos Eppendorf a – 20 °C até o momento do uso.

4.1.7.1 Dot blot

Uma membrana de nitrocelulose foi umedecida com salina tamponada com Tris (TBS, NaCl a 137 mM, Tris 24,8 mM, pH 7,5) e colocada em um aparelho para impregnação de 96 poços (*blotter*, Bio-Rad Laboratories). Depois disso, 150 μ L de cada sobrenadante obtido de cultura de células High-five, inoculadas com baculovírus *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* (MOI 2, 5 ou 10) ou *AcBac Δ CC-pFastBac1* (MOI 10) e cultivadas em diferentes tempos de infecção (TOI) de 24, 48 ou 72 h, foram usados para impregnar áreas circulares da membrana de nitrocelulose, correspondentes ao fundo de poços do aparelho de impregnação, pela aplicação de vácuo. A membrana de

nitrocelulose foi retirada do aparelho e bloqueada com leite desnatado a 5 % em salina tamponada com Tris e Tween 20 a 0,05 % (v/v) por 2 horas a temperatura ambiente (TBS-T-L). A membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS e Tween 20 a 0,05% (TBS-T). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina, extremidade c-terminal (R93025, Invitrogen), diluído 1:5000 em TBS-T-L, sob agitação suave, durante 1 hora à temperatura ambiente. A membrana foi, então, lavada mais 3 vezes com TBS-T. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo (IgA, IgM e IgG) conjugados a fosfatase alcalina (Sigma Aldrich), diluídos de 1:500 em TBS-T-L, sob agitação suave, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T e uma vez com TBS. A membrana foi revelada pela adição de substrato a fosfatase alcalina [33 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, Sigma-Aldrich) a 50 mg/mL e 330 µL de nitroazul tetrazólio (NBT, Sigma- Aldrich) a 10 mg/mL em 10 mL do tampão Tris a 100 mM, NaCl a 100 mM e MgCl₂ a 5 mM, pH 9,5]. A reação de revelação foi interrompida após cerca de 10-20 minutos pela adição de água destilada.

4.1.8 Produção da proteína recombinante

Células High-five em fase logarítmica de proliferação cultivadas em suspensão na concentração 2×10^6 /mL, em volumes de 50 a 100 mL, foram infectadas com 5 partículas virais para cada célula (MOI 5). Em um dos frascos de cultura, tunicamicina (Sigma-Aldrich) foi adicionada para alcançar uma concentração de 5 µg/mL, com objetivo de determinar a presença de N-glicosilação na proteína recombinante produzida. Após 48 horas, cada suspensão celular foi centrifugada a $3.000 \times g$ por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes resultantes foram centrifugados a $30.000 \times g$, por 1 hora a 4 °C, para remoção das partículas virais. Os sobrenadantes finais foram armazenados a - 70 °C até o momento do uso.

4.1.9 Purificação de IL-7 canina recombinante por cromatografia de afinidade

A proteína recombinante foi purificada de 3 lotes de sobrenadante de cultura por cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna Sepharose quelada com níquel (coluna HisTrap HP, General Electrics Heathcare, Piscataway, EUA). Antes da purificação de cada lote, o sobrenadante foi submetido à diálise contra solução salina

tamponada com fosfato PBS (NaCl a 137 mM, KCl a 2,68 mM, Na₂HPO₄ a 9,58 mM e NaK₂PO₄ a 1,47 mM, pH 7,4), pela aplicação de 2-3 banhos diários, por até 2 dias. A purificação da proteína foi realizada seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, os sobrenadantes de cultura pós-diálise receberam imidazol para atingir a concentração final de 30 mM. Além disso, um dos lotes recebeu NaCl para alcançar a concentração de 0,5 M. A coluna cromatográfica foi equilibrada com PBS com imidazol a 30 mM ou PBS com imidazol a 30 mM e NaCl a 1 M. Os sobrenadantes dialisados foram aplicados à coluna. A coluna foi lavada com PBS com imidazol a 30 mM ou PBS com imidazol a 30 mM e NaCl a 1 M. A coluna foi eluída com PBS com NaCl a 1 M e um gradiente contínuo de imidazol de 30 a 500 mM ou com PBS e imidazol a 500 mM.

Para avaliar a presença de N-glicosilação na proteína recombinante, sobrenadante de cultura de células High-five obtidas na presença de tunicamicina foi submetido à purificação conforme descrito previamente.

As frações cromatográficas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15 %, conforme método previamente descrito (LAEMMLI, 1970). As frações contendo a proteína recombinante foram submetidas à troca de tampão para PBS através de diálise ou da coluna cromatográfica de gel filtração (His-Trap Desalting, General Electrics Healthcare). Alíquotas foram preparadas com a proteína dialisada ou mistura das frações cromatográficas de gel filtração, filtradas (0,22 µm) e armazenadas a -70 °C, até o momento do uso. Uma alíquota de cada lote produzido na ausência de tunicamicina foi submetida à determinação da concentração protéica, pelo método do ácido bicinconínico (Micro BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific), assim como para avaliação quanto à presença de endotoxinas (lipolissacarídeos, LPS) (Charles River Endosafe[®], Charleston, SC, EUA).

4.1.10 SDS-PAGE e *Western blot*

A análise da proteína recombinante canina (rcaIL-7) produzida no sistema baculovírus célula de inseto (BEVS) e/ou purificada por cromatografia de afinidade foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *Western blot* utilizando o sistema de gradiente descontínuo com gel de separação a 12 ou 15 %, conforme método previamente descrito (LAEMMLI, 1970). Foram aplicadas e avaliadas em gel de poliacrilamida amostras referentes à purificação de rcaIL-7 na

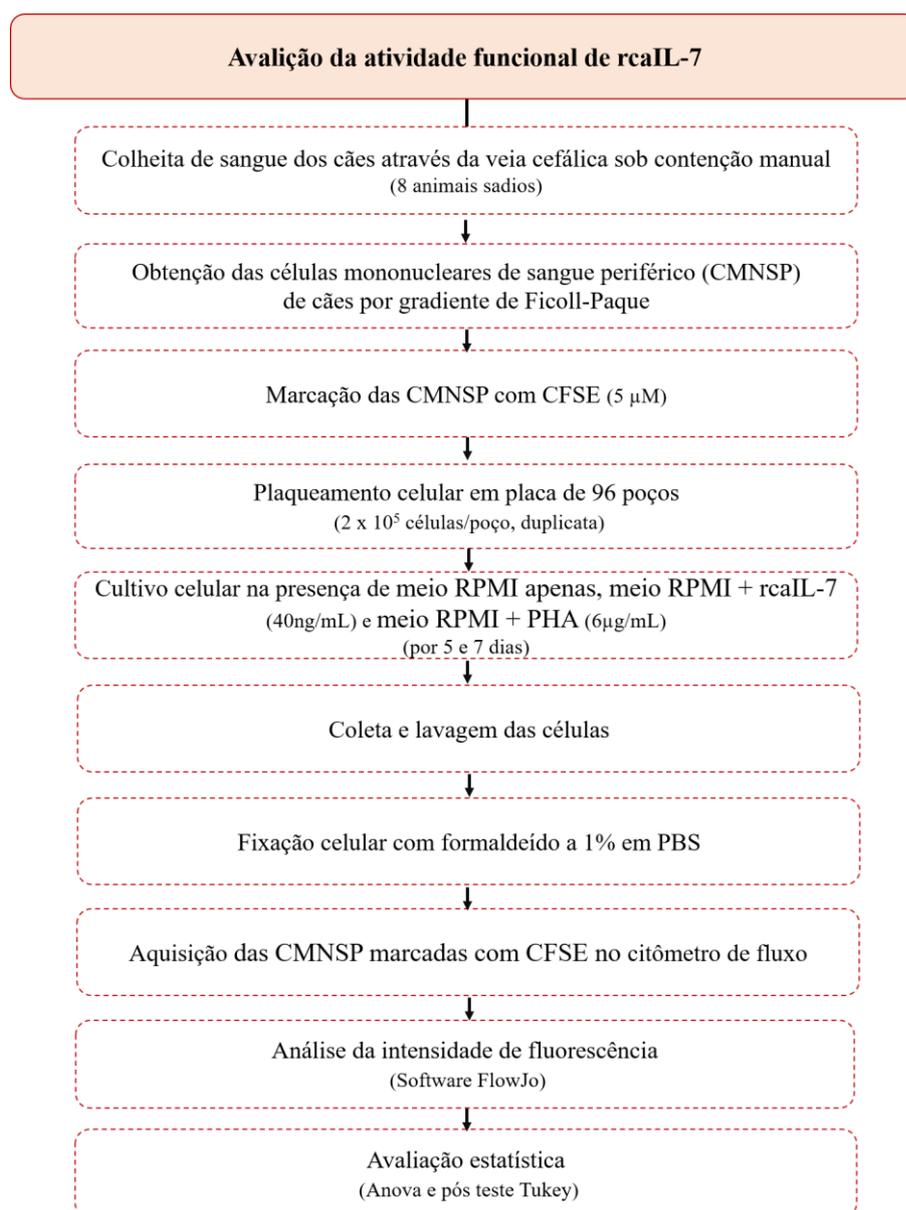
ausência de Tunicamicina: a) amostra aplicada na coluna (afluente); b) material que não se prendeu à coluna (efluente); c) frações de eluição contendo a proteína rcaIL-7 purificada. Foram aplicadas em gel para análise por *Western blot*: a) sobrenadante de células High-Five infectadas com baculovírus recombinante *AcBacΔCC-GP64caIL-7* e, a proteína purificada por cromatografia de afinidade, b) rcaIL-7 (2 µg); c) rcaIL-7 (1 µg).

Para a realização do *Western blot*, foi utilizado o método de transferência úmido em um aparelho *transblotter* da BIO-RAD (BIO-RAD, Hercules, EUA) para a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana nitrocelulose, seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, foi preparado um Sandwich com papel de filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose e papel de filtro umedecido com tampão Tris [Tris a 24 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20 % (v/v), 0,1% SDS, pH 8.3]. O Sandwich foi colocado no aparelho de transferência e foi aplicada uma corrente elétrica de 200 mA por 16-18h a 25 °C. Depois disso, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau [Ponceau S a 0,1 % (m/v) e ácido acético a 5 % (m/v)] para identificação das raias. A revelação de proteína com cauda de histidina na membrana de nitrocelulose foi realizada conforme método descrito para o ensaio de “dot-blot”.

4.2 ENSAIO BIOLÓGICO DE rcaIL-7 UTILIZANDO CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE CÃES SADIOS

4.2.1 Desenho Experimental

Trata-se de um estudo experimental para avaliar a capacidade de rcaIL-7 de promover expansão de células mononucleares de sangue periférico de cães sadios por citometria de fluxo.



4.2.2 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, protocolo n° 021/2011) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) – FIOCRUZ/BA.

4.2.3 Animais

Oito cães adultos, sadios, 3 machos e 5 fêmeas, sem raça definida, com idade entre 4-7 anos foram usados. Os cães foram obtidos do Centro de Controle de Zoonose (CCZ) ou doados por proprietários particulares ainda filhotes. Os cães foram mantidos com água e ração *ad libitum* no canil do CPqGM além de serem tratados para endo e ectoparasitos e vacinados contra algumas viroses (Cinomose, Parvovirose, Coronavirose, Adenovirose tipo II, Parainfluenza, Hepatite infecciosa canina) e leptospirose.

4.2.4 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) de cães

Uma amostra de 20 mL sangue foi coletada da veia cefálica, em seringa heparinizada, de cada um dos oito cães. As amostras de sangue foram diluídas de 1:2 em solução salina estéril. Em seguida, volumes de 20 mL de sangue diluído foram colocados sobre 10 mL de Ficoll em tubos de poliestireno estéreis, de fundo cônico, de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 450 x g (Centrifuges 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a 20 °C durante 30 minutos. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares, localizada na interfase entre a camada de Ficoll e constituintes do plasma, foi coletada, transferida para um tubo de 50 mL estéril e cerca de 40 mL de cloreto de sódio a 0,9% (solução salina) foram adicionados para lavagem das células. O procedimento de lavagem foi realizado com centrifugação das células a 450 x g por 10 minutos a 4 °C. Cada sedimento celular foi ressuspensado com 10 mL de solução salina estéril. Uma alíquota de cada suspensão foi utilizada para contagem das células, usando-se azul tripan a 0,04 % e uma câmara de Neubauer.

4.2.5 Ensaio de linfoproliferação

Cerca de 1×10^7 células/mL CMNSP de cada cão foram ressuspensas em 2 mL de PBS com albumina sérica bovina (BSA) a 0,1% em (m/v) em um tubo de 15 mL. Em seguida, 2 µL de carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester (CFSE) (CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen) a 5 µM foram adicionados a cada suspensão celular. As células foram incubadas por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, 10 mL de meio RPMI (Instituto Roswell Park Memorial, RPMI 1640, Sigma-Aldrich) suplementado com 50 µg/mL de sulfato de gentamicina foram adicionados a cada tubo de 15 mL. As células

foram incubadas por 5 minutos a 4 °C e centrifugadas a 450 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão em 10 mL de RPMI (gelado) e centrifugado 450 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Esse processo de lavagem foi repetido por mais 2 vezes. Posteriormente, as células de cada cão foram ajustadas para a concentração de 2×10^6 /mL com de cultura RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado com 10 mM de HEPES (pH 7,0), 10 % de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 10 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) (meio RPMI completo). Em uma placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning), foram colocadas 2×10^5 CMNSP por poço. Em duplicata de poços, as células de cada cão foram cultivadas apenas com meio de cultura RPMI completo ou RPMI completo com fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich) a 6 µg/mL e rcaIL-7 a 40 ng/mL. Células não marcadas com CFSE foram utilizadas como controle do experimento. As placas foram incubadas por 5 e 7 dias a 37 °C com 5 % de CO₂. Depois disso, a suspensão celular de cada duplicata de poços foi coletada e misturada em um único tubo de poliestireno e 2 mL de PBS (m/v) foram adicionados aos tubos. As células foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído a 1 % em PBS (m/v) e mantidas à 4 °C para posterior leitura em Citômetro de Fluxo (LSRFortessa BD, San Jose, EUA), onde se analisou um total de 10.000 eventos por aquisição/amostra.

4.2.6 Análise de proliferação celular por Citometria de Fluxo

As subpopulações celulares foram identificadas através das propriedades de dispersão frontal de luz (FSC) e dispersão lateral de luz (SSC) que permitem a avaliação do tamanho e a granulosidade, respectivamente. Para isso, foi utilizado um Citômetro de Fluxo (LSRFortessa BD, San Jose, EUA), sendo os eventos obtidos por meio de um programa de computador (FACSDiva BD, v.6.1.3, San Jose, EUA). A fluorescência de linfócitos marcados com CFSE foi detectada usando-se um filtro FL-1 (488 nm). Antes da aquisição de eventos, o citômetro foi calibrado com células não marcadas. Os dados obtidos foram analisados através do programa FlowJo (versão 7.6, Tree Star, Ashland, EUA). O índice de divisão celular e a porcentagem de células divididas foram determinados pelo programa FlowJo. O índice de divisão celular (ID) é a média do número de divisões celulares que as células sofreram, ignorando as células que

permanecem na geração zero. A porcentagem de células divididas corresponde a porcentagem de células da amostra original que se dividiram.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação do efeito proliferativo promovido pela rcaIL-7 foi feita por ANOVA seguido do pós-teste Tukey. O valor de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. O programa GraphPad Prism (San Diego, EUA), versão 5.0, foi utilizado para as análises

5. RESULTADOS

Visando a obtenção da citocina IL-7 canina para futuro uso em estudos de imunomodulação no cão, no presente trabalho, foram realizados ensaios para produção do bacmídeo e baculovírus recombinantes para a produção da proteína recombinante na forma secretada em células de inseto.

Para a obtenção do bacmídeo recombinante foi utilizada uma construção de DNA previamente concebida em nosso laboratório e sintetizada quimicamente pela GenScript.

5.1 SUBCLONAGEM DA CONSTRUÇÃO DE DNA *GP64caIL-7* DO PLASMÍDEO *pUC57* PARA O PLASMÍDEO *pFastBac1*

Com o propósito de se obter a construção *GP64-caIL-7* em um plasmídeo carreador apropriado para posterior transferência para o bacmídeo, a construção plasmideal *pUC57-GP64caIL-7* e o plasmídeo *pFastBac1* foram digeridos por endonucleases de restrição (*SalI* e *NotI*) e os fragmentos de DNA correspondentes a *GP64caIL-7* e ao plasmídeo desprovido de segmento de DNA do sítio múltiplo de clonagem foram ligados, dando origem a construção *pFastBac1-GP64caIL-7*. Para avaliar o sucesso da subclonagem, amostras de plasmídeo obtidas de 10 colônias (clones) de *E. coli* DH5alfa transformada com o produto de ligação entre o inserto *GP64-IL-7* e *pFastBac1* foram submetidas a digestão enzimática (*Sal I* e *Not I*) e eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Plasmídeo proveniente de 7 dos 10 clones examinados apresentaram duas bandas de DNA com cerca de 4755 e 622 pares de bases (bp), compatíveis com o plasmídeo *pFastBac1* sem o segmento do sítio múltiplo de clonagem e a construção *GP64caIL-7* (Figura 3), sugerindo que a subclonagem foi realizada com sucesso.

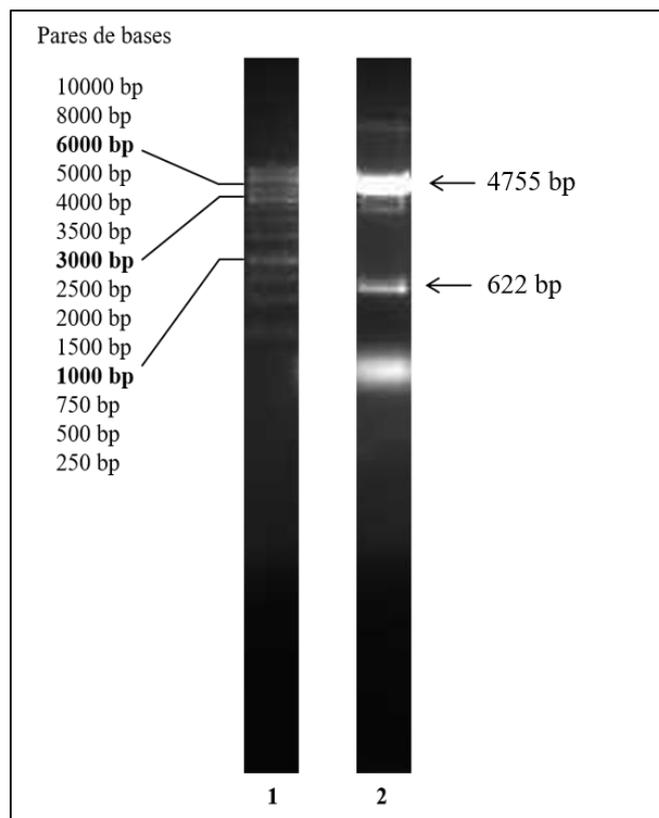


Figura 3: Avaliação por eletroforese em gel de agarose de plasmídeo purificado de *E. coli* transformada com o produto de ligação entre *GP64caIL-7* e *pFastBac1*. Exemplo representativo de amostras de plasmídeo purificado de *E. coli* transformada com o produto de ligação entre *GP64caIL-7* e *pFastBac1* contendo inserto. Uma amostra de 4 μ l de mini-preparação de plasmídeo foi digerida com as endonucleases de restrição *Sal* I e *Not* I em analisadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio por eletroforese. Raia 1: marcadores de pares de bases (pb) e Raia 2: amostra de plasmídeo digerido. Setas indicam bandas com 4755 pb e 622 pb, correspondentes ao plasmídeo *pFastBac1* digerido e ao inserto *GP64caIL-7*.

5.2 TRANSPOSIÇÃO DO SEGMENTO DE DNA ENTRE *Tn7L* E *Tn7R* DA CONSTRUÇÃO PLASMIDEAL *pFastBac1-GP64CAIL-7* PARA O CROMOSSOMA ARTIFICIAL DO BACULOVÍRUS

Para transferir o segmento de DNA entre *Tn7L* e *Tn7R*, que contém *GP64-caIL-7*, da construção plasmideal carreadora para o cromossoma artificial do baculovírus (bacmídeo, AcBac Δ CC), uma amostra de *E. coli* DH10Bac Δ CC, que contém um bacmídeo e um plasmídeo auxiliar que codifica uma transposase, foi transformada com o plasmídeo recombinante *pFastBac1-GP64-caIL-7* e cultivada em meio LB agar-kan-tet-gen-IPTG-X-gal, gerando colônias azuis e colônias brancas. As colônias brancas representam colônias de *E. coli* cujo inserto foi transferido para cromossoma artificial do baculovírus promovendo inativação insercional do segmento de DNA que codifica o fragmento alfa

da beta-galactosidade presente no bacmídeo. Amostra de uma colônia branca foi semeada em uma placa de petri meio LB agar-kan-tet-gen-IPTG-X-gal para confirmação do fenótipo, dando origem a incontáveis colônias, sendo todas brancas.

Para confirmar a transposição do segmento de DNA entre *Tn7L* e *Tn7R*, que inclui o inserto *GP64-caIL-7*, para o cromossoma artificial do baculovírus, uma amostra de bacmídeo extraído de uma colônia branca de *E. coli* DH10BAC Δ CC transformada com a construção plasmideal *pFastBac1-GP64caIL-7* e fenótipo confirmado foi usada como molde para PCR. A PCR foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam os sítios *Tn7L* e *Tn7R* do bacmídeo. O produto da PCR, avaliado por eletroforese em gel de agarose, mostrou uma banda de DNA com aproximadamente 3.000 pb (Figura 4), correspondente ao segmento de DNA transferido do *pFastBac1* (2300 pb) contendo o inserto *GP64caIL-7* (635 pb), o que indica que a transposição e obtenção do bacmídeo recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* foi realizada com sucesso.

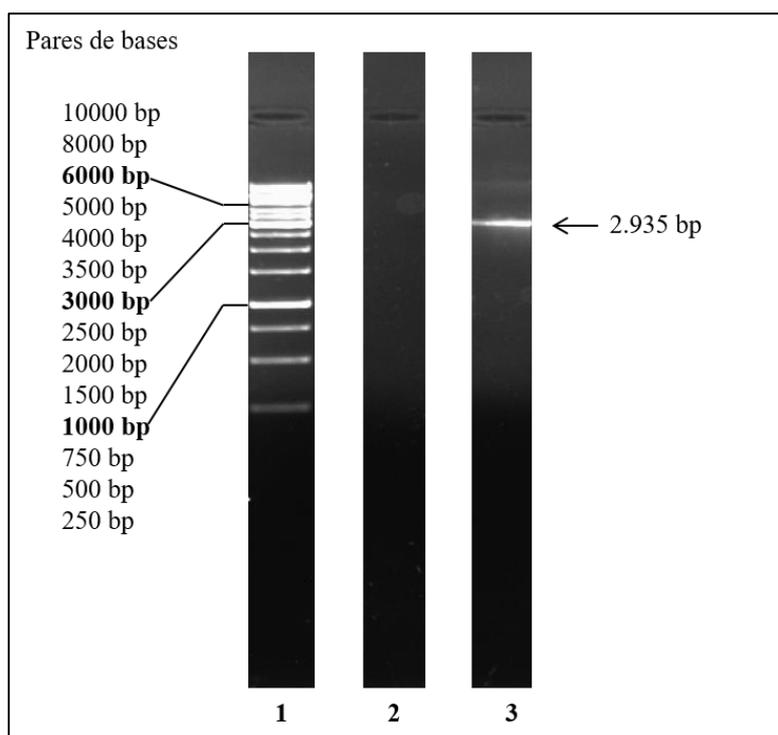


Figura 4: Avaliação do produto de PCR de bacmídeo por eletroforese em gel de agarose. Produto de PCR realizada com oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam os sítios *Tn7R* e *Tn7R* e bacmídeo extraído de uma colônia branca de *E. coli* DH10BAC Δ CC com fenótipo confirmado transformada com *pFastBac1-GP64caIL-7* foi avaliado em um gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio por eletroforese. Raias: 1) marcador de pares de bases (pb), 2) produto de PCR em reação com água ao invés de DNA e 3) produto

de PCR em reação com DNA de bacmídeo. Seta indica banda de DNA com cerca de 3000 pb, correspondente a segmento de DNA transferido do *pFastBac1* (2300 pb) contendo o inserto *GP64caIL-7* (635 pb).

5.3 OBTENÇÃO DE ESTOQUE VIRAL PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para a obtenção do estoque viral para produção da proteína recombinante, células Sf9 foram inicialmente transfectadas com o bacmídeo recombinante *AcBacΔCC-GP64caIL-7* em lipofectamina e, depois, infectadas com partículas virais usando-se MOI 0,1. Os sobrenadantes de cultura resultantes da transfecção (P1) e da amplificação viral (P2 e P3) foram titulados, pelo ensaio de diluição limitante. Os estoques P1, P2 e P3 do vírus recombinante exibiram o título TCID₅₀ de $5,62 \times 10^7$ /mL, $3,99 \times 10^8$ /mL e $6,9 \times 10^8$ /mL, respectivamente.

5.4 PRODUÇÃO DA RCAIL-7

Visando determinar as melhores condições para produção da proteína recombinante em sobrenadante de cultura de células de inseto, células High-five foram inoculadas com baculovírus recombinante *AcBacΔCC-GP64caIL-7* usando-se MOI 2, 5 e 10 e amostras de sobrenadante foram avaliadas após 24, 48 e 72 h. Sobrenadante de células High-five inoculadas com baculovírus *AcBacΔCC-pBastBac1* com MOI 10 foi usado como controle negativo. A avaliação do sobrenadante de cultura foi realizada pela técnica de *dot blot* utilizando-se para isso um anticorpo monoclonal de camundongo anti-histidina, um conjugado a fosfatase alcalina.

No ensaio *dot blot*, a membrana de nitrocelulose não exibiu sinal significativo quando foi usado sobrenadante de 24, 48 ou 72 h (TOI) de cultura com células infectadas com baculovírus *AcBacΔCC-pBastBac1* (controle negativo) com MOI 10 ou sobrenadante de 24 h de cultura com células infectadas com baculovírus recombinante *AcBacΔCC-GP64caIL-7* com MOI 2 (Figura 5). Entretanto, a membrana de nitrocelulose revelou sinal progressivamente maior quando foi usado sobrenadante de cultura de células infectadas com *AcBacΔCC-GP64caIL-7* com MOI 5 e TOI 24 h, MOI 10 e TOI 24 h, MOI 2 e TOI 48 h, e MOI 5 e TOI 48 h. O sinal observado para sobrenadante de cultura de células infectadas com *AcBacΔCC-GP64caIL-7* com MOI 5 e TOI 48 h e MOI 10 e TOI 48 h foi semelhante. Esse último sinal foi maior que o apresentado para MOI 2

e TOI 72 h, MOI 5 e TOI 72 h ou MOI 10 e TOI 72 h (Figura 5). A partir desses resultados, a condição de MOI 5 e TOI 48 h foi escolhida a para a produção da rcaIL-7.

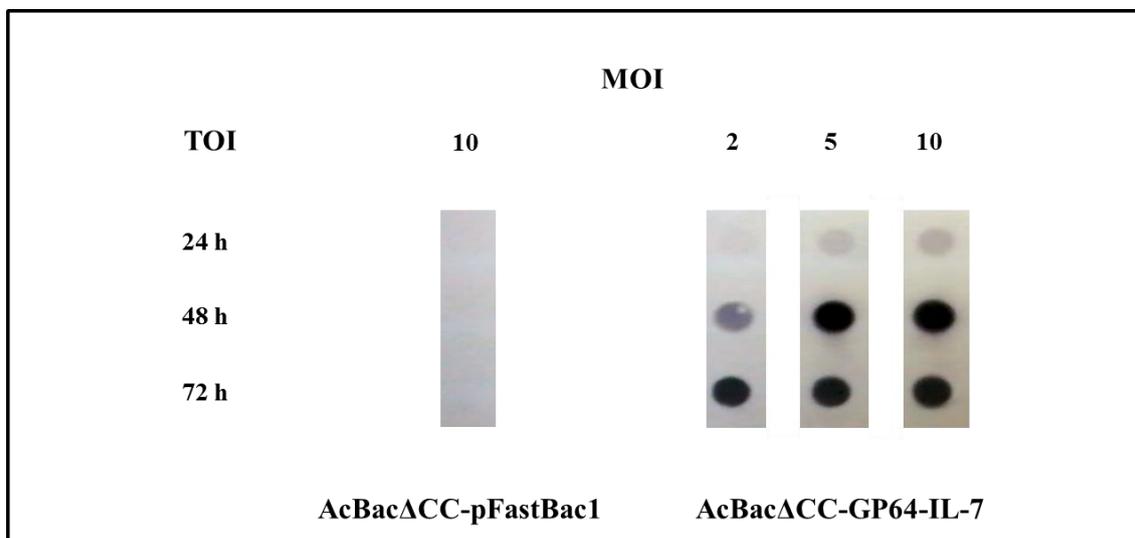


Figura 5: Ensaio para a otimização da produção de IL-7 canina em células High-five infectadas com baculovírus recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7*. Os sobrenadantes de cultura de células High-five infectadas com baculovírus *AcBac Δ CC-pFastBac1* (controle negativo) com MOI 10 (multiplicidade de infecção) ou *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* com MOI 2, 5 ou 10 pelo tempo de 24, 48 ou 72 h (TOI, tempo de infecção) foram avaliados por dot blot. O dot blot foi realizado usando-se anticorpo anti-histidina região c-terminal, conjugado a fosfatase alcalina.

5.4.1 Avaliação da produção e purificação da rcaIL-7

Para a produção da proteína recombinante, células High-five cultivadas em suspensão foram inoculadas com MOI 5 e por 48 h e, depois disso, o sobrenadante livre de células e de partículas virais foi dialisado contra PBS. A proteína presente no sobrenadante dialisado foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-níquel. A análise das frações cromatográficas livres de proteínas contaminantes realizada por SDS-PAGE e gel corado por azul de Coomassie mostrou duas bandas moderadamente largas com peso molecular médio de 27 e 30 kDa e uma banda com tamanho médio de 25 kDa (Figura 6A, raias 7, 8 e 9), que possivelmente representam isoformas glicosiladas da rcaIL-7. Como o peso molecular predito para proteína recombinante desprovida da sequência líder é de 18,7 kDa, para avaliar a presença de N-glicosilação, que justificasse o encontro de bandas com maior peso molecular, células High-five foram infectadas com baculovírus recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* com MOI 5 e TOI 48 h em meio de cultura com 5 μ g/mL de

tunicamicina. Depois disso, o sobrenadante obtido foi dialisado contra PBS e submetido à purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-níquel. Curiosamente, após a diálise, observou-se a formação de um material precipitado de coloração esbranquiçada (dados não mostrados), fato não ocorrido com o sobrenadante de células High-five infectadas com baculovírus recombinante *AcBacΔCC-GP64-caIL-7* obtido na ausência de tunicamicina. A análise das frações cromatográficas livres de proteínas contaminantes em gel de poliacrilamida corado por azul de Coomassie, mostrou em conjunto 3 bandas, com peso molecular de cerca de 13, 17 e 27 kDa (Figura 6B, raias 7, 8 e 9). Provavelmente, a banda de 27 kDa representa a proteína parcialmente glicosilada, enquanto que as bandas menores de 13 e 17 kDa, possivelmente, correspondem à proteína parcialmente degradada e/ou não glicosilada.

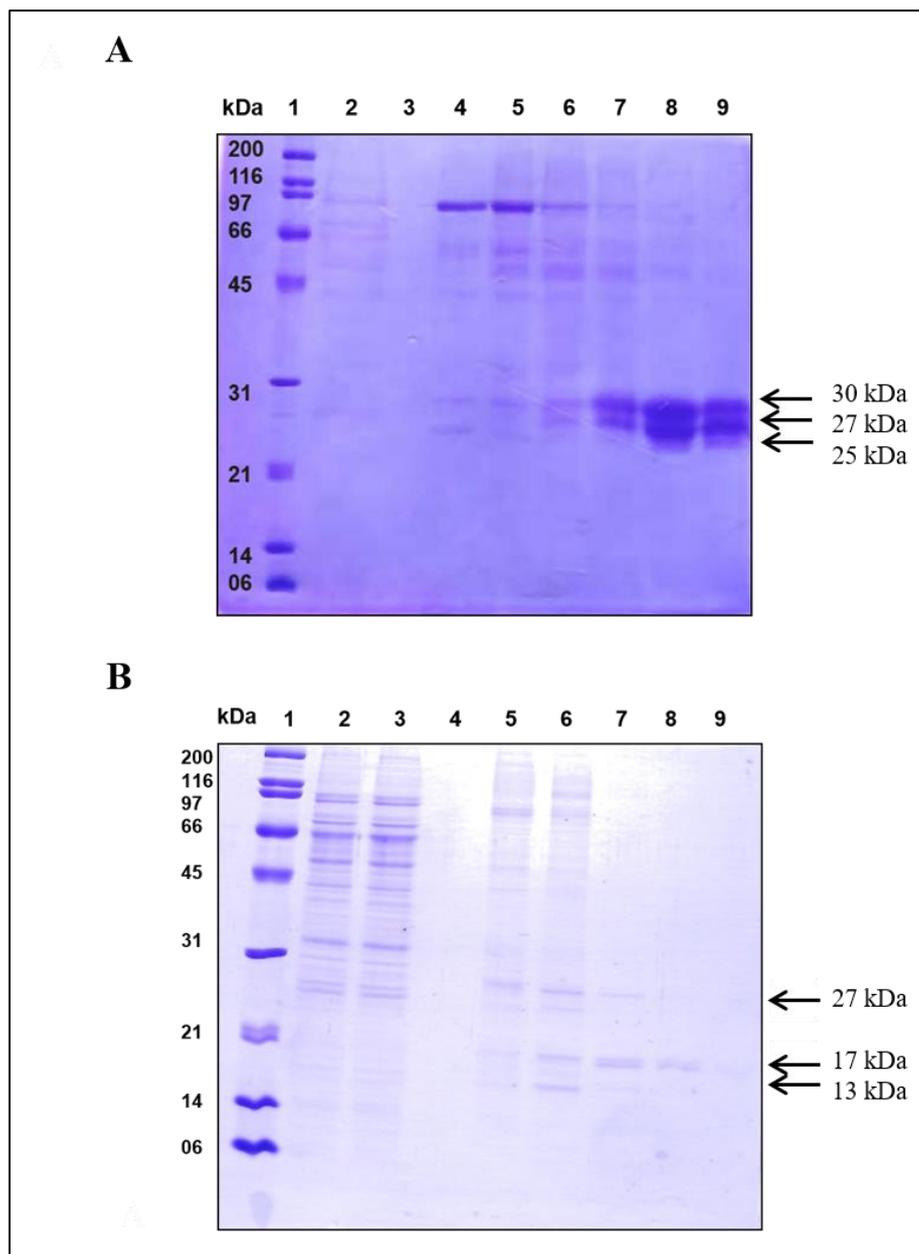


Figura 6: Avaliação da purificação da rcaIL-7 canina por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). Interleucina 7 recombinante canina (rcaIL-7) purificada na ausência de tunicamicina (A), representando os 3 lotes produzidos, e na presença de Tunicamicina (B), lote único. Raia 1: marcador de peso molecular; raia 2: amostra aplicada na coluna (afluente); raia 3: material que não se prendeu à coluna (efluente); raias 4, 5, 6, 7, 8 e 9: frações de eluição. Considerando as raias 7, 8 e 9, as setas indicam em: (A) três bandas correspondentes a rcaIL-7 purificada (25, 27 e 30 kDa) com diferentes padrões de glicosilação e, em (B) três bandas correspondentes, possivelmente, a proteína (rcaIL-7) parcialmente degradada e/ou não glicosilada (13, 17 kDa) e a forma parcialmente glicosilada da rcaIL-7 (27 kDa), respectivamente.

Para avaliar em maior detalhe possíveis isoformas e produtos de degradação da proteína, uma amostra do sobrenadante de cultura de células High-five infectadas com baculovírus recombinante (*AcBacACC-GP64-caIL-7*) com MOI 5 por 48 h e uma amostra da mistura das frações cromatográficas livres de proteínas recombinantes, obtidas na

ausência de tunicamicina, foram examinadas por *Western blot*, usando-se anticorpo monoclonal de camundongo anti-histidina, que é capaz de detectar a extremidade carboxila da rcaIL-7 (Figura 7). Na raia da membrana impregnada com proteínas do sobrenadante contendo rcaIL-7, produzida na ausência de tunicamicina, foram encontradas três bandas, com peso molecular de cerca de 25, 27 e 30 kDa. Curiosamente, a banda de 27 kDa foi a mais intensa (Figura 7, raia 2). Na raia da membrana impregnada com proteínas da amostra das frações cromatográficas, produzida na ausência de tunicamicina, foram observadas duas bandas moderadamente largas com peso molecular médio de 27 e 30 kDa (Figura 7, raias 3 e 4) e uma banda com tamanho médio de 25 kDa (Figura 7, raia 3), correspondentes as bandas descritas previamente no ensaio de SDS-PAGE. Esses dados sugerem que as três bandas representam isoformas da rcaIL-7. Quando uma menor quantidade de proteína purificada foi usada no ensaio, foram observadas apenas as bandas com 27 e 30 kDa (Figura 7, raia 4).

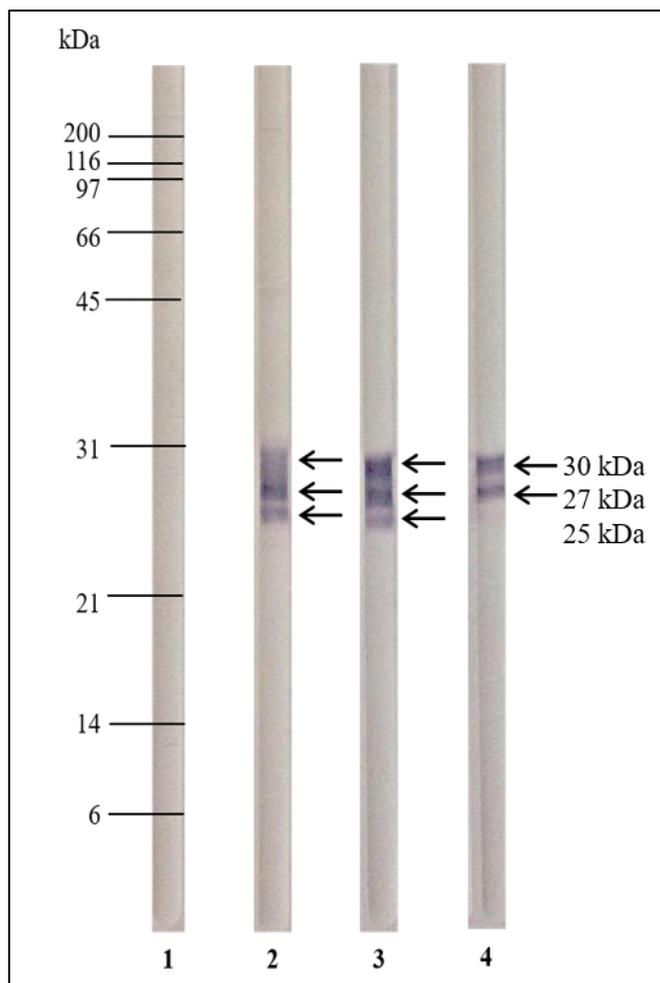


Figura 7. Detecção por Western blot da proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade. Raia 1: marcador de peso molecular; raia 2: sobrenadante de células High-Five infectadas com baculovírus recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7*; raias 3 e 4: proteína purificada na ausência de tunicamicina, *rcaIL-7* (2 μ g) e *rcaIL-7* (1 μ g), respectivamente. As raias foram incubadas com anticorpo anti-histidina c-terminal na diluição de 1:1000 e com anticorpos anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:500. A revelação foi feita pela adição do substrato contendo BCIP e NBT, conforme descrito em material e métodos. As setas indicam: a) raias 2 e 3, bandas da proteína recombinante (30, 27, 25 kDa); b) raia 4, bandas da proteína recombinante (30, 27 kDa).

Depois da purificação da *rcaIL-7*, as frações cromatográficas livres de proteínas contaminantes foram misturadas. A mistura foi submetida à troca de tampão para PBS pelo método de diálise ou pelo uso de coluna cromatográfica de gel filtração e a determinação protéica foi feita pelo método do ácido bicinonínico. Considerando, o volume de sobrenadante de cada lote de purificação, o volume e a concentração proteína das misturas de frações cromatográficas livres de proteínas recombinante, estimou-se um rendimento de 5,6 mg (1º lote), 4,5 mg (2º lote) e 6,5 mg (3º lote) da *rcaIL-7* para cada litro de cultura. A concentração de endotoxinas encontrada no 1º lote, o qual foi utilizado para os ensaios *in vitro*, foi < 0,5 EU/mL, ou seja 0,002 EU/mg de *rcaIL-7* purificada.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE rcaIL-7 PRODUZIDA EM CÉLULAS HIGH-FIVE INFECTADAS COM BACULOVÍRUS RECOMBINANTE

Para avaliar a atividade biológica da citocina recombinante, CMNSP de oito cães saudáveis marcadas com CFSE foram cultivadas na presença de: a) meio RPMI completo apenas (controle negativo), b) PHA a 6 µg/mL (controle positivo do ensaio) e c) rcaIL-7 a 40 ng/mL, por 5 ou 7 dias. Depois disso, a proliferação de linfócitos foi avaliada pela redução de fluorescência correspondente ao CFSE por citometria de fluxo.

Inicialmente, as CMNSP adquiridas pelo citômetro de fluxo foram avaliadas quanto ao tamanho e a granulosidade e uma janela foi colocada para delimitar a população de linfócitos (Figura 8A). A partir daí foi examinada a fluorescência correspondente ao CFSE da população de linfócitos cultivados na presença de meio RPMI completo, PHA a 6 µg/mL ou rcaIL-7 a 40 ng/mL (Figura 8B, C E D).

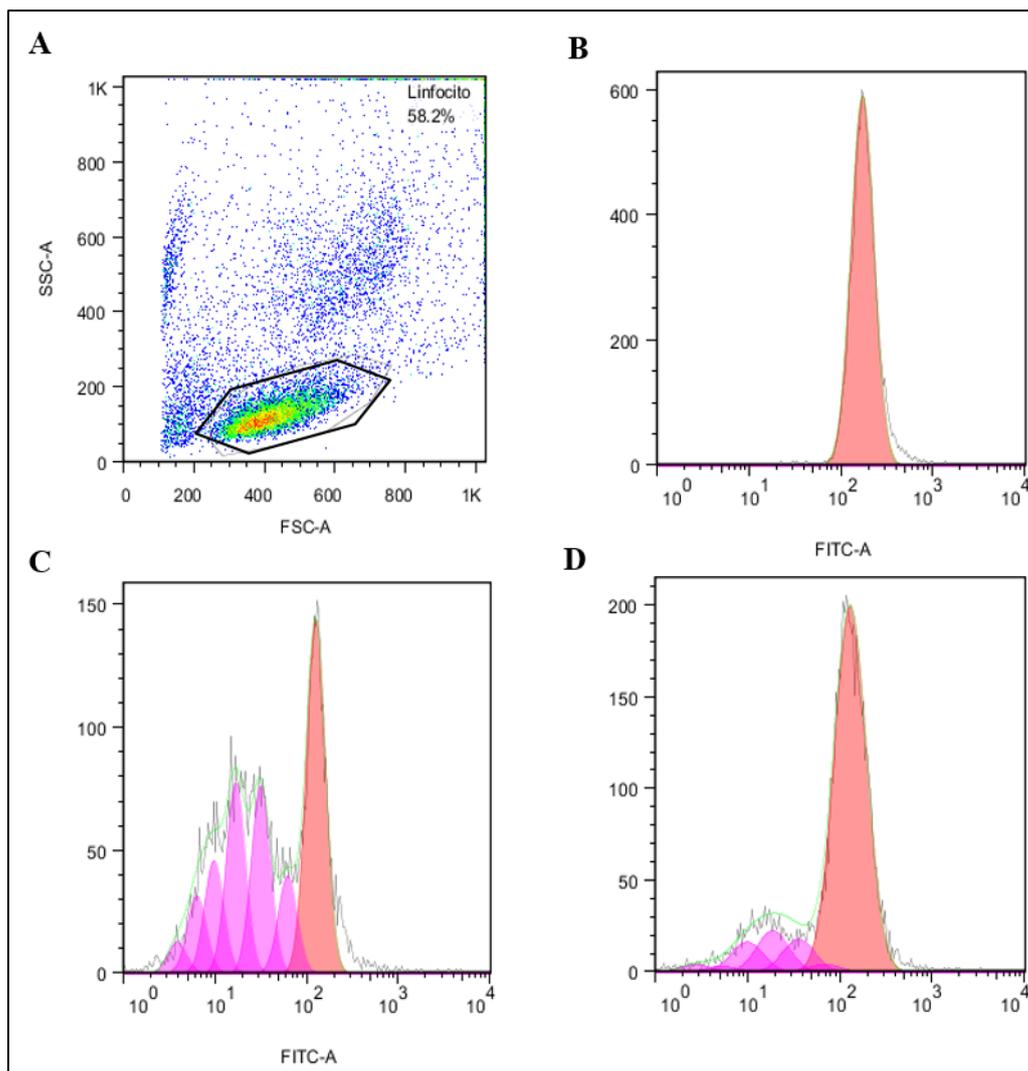


Figura 8: Perfil das amostras marcadas com CFSE e analisadas pelo programa FlowJo. A - População de linfócitos selecionados para análise. **B** – Pico ou geração zero representando CMNSP que não proliferaram, cultivadas na presença do meio de cultura, apenas. **C** – Geração zero e seis gerações de CMNSP cultivadas na presença de fitohemaglutinina (PHA) a 6 $\mu\text{g/mL}$. **D** – Geração zero e cinco gerações de CMNSP estimuladas com a citocina recombinante canina (rcaIL-7) a 40ng/mL. Cada geração representa uma divisão celular.

A figura 9 mostra os resultados de porcentagem de divisão dos linfócitos após 5 e 7 dias de cultivo com meio de cultura, rcaIL-7 a 40 ng/mL, PHA a 6 $\mu\text{g/mL}$. Após 5 dias de cultivo, os valores encontrados de porcentagem de células divididas (%D), expressos em média, foram de 2,85% (células cultivadas com meio de cultura), 7,42% (rcaIL-7) e 63,59% (PHA). Nessa avaliação, houve um aumento na porcentagem de divisão celular dos linfócitos de 2,6 vezes quando essas células foram cultivadas na presença de rcaIL-7 em comparação às células cultivadas apenas com meio de cultura. Os resultados obtidos

com o uso dos mitógenos demonstraram que o ensaio foi realizado em condições apropriadas para a avaliação de proliferação celular.

Já em relação ao 7º dia de cultivo, os valores encontrados de %D foram de 5,8 % (células cultivadas com meio de cultura), 9,9 % (rcaIL-7) e 67,4 % (PHA). A porcentagem de divisão celular dos linfócitos foi de 1,7 vezes quando essas células foram cultivadas na presença de rcaIL-7 em comparação às células cultivadas apenas com meio de cultura.

A análise estatística dos dados de proliferação, realizada por ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, mostrou diferença significativa na proliferação de CMNSP cultivadas na presença de rcaIL-7 em relação às células cultivadas apenas com meio de cultura, tanto com 5 quanto 7 dias de cultivo ($p < 0,001$).

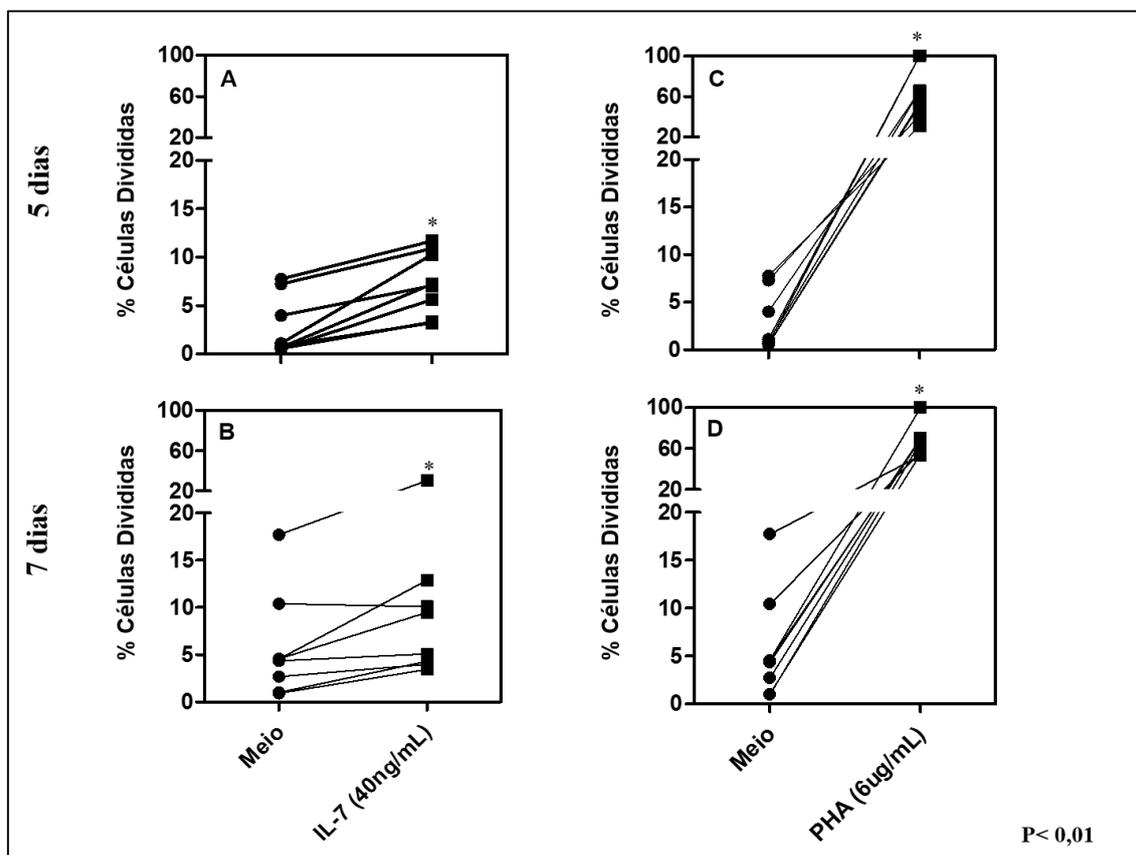


Figura 9. Proliferação de linfócitos de cão após estimulação com rcaIL-7. CMNSP de cada um dos 8 cães saudáveis foram coradas com CFSE e cultivadas apenas com meio de cultura RPMI completo ou RPMI completo com rcaIL-7 a 40 ng/mL (A e B) e fitohemaglutinina (PHA) a 6 µg/mL (C e D), por 5 e 7 dias. A avaliação da proliferação celular foi feita por citometria de fluxo e os resultados foram representados como porcentagem de células divididas (%D).

Tomando os dados em conjunto, rcaIL-7 (40 ng/mL) é capaz de promover a proliferação de CMNSP de cães, acima da proliferação basal. Experimentos para

identificação de qual(is) subpopulação(ões) de linfócitos é (são) preferencialmente expandida(s) (células T CD4 e/ou CD8, *naïve* e/ou células de memória) pela ação dessa citocina estão em andamento.

6. DISCUSSÃO

Visando a avaliação, em um futuro próximo, da utilidade de IL-7 canina como agente imunomodulador em cães, no presente trabalho, a sequência de DNA que codifica IL-7 canina (proteína madura) juntamente com a sequência líder da GP64 do AcMNPV foi inserida no cromossoma artificial do baculovírus, depois disso, foi obtido baculovírus recombinante. O baculovírus recombinante foi usado para produzir rcaIL-7 em células High-five com um rendimento médio de 5,5 mg por litro de cultura. A rcaIL-7 produzida no sistema baculovírus células de inseto mostrou-se capaz de promover a proliferação de linfócitos de sangue periférico de cães.

A construção de DNA para produção do rcaIL-7 foi elaborada de modo a codificar da extremidade 5' para a 3'. Para isso, elementos com grande capacidade de promover a secreção ou a tradução da proteína, foram utilizados como: a) sequência de nucleotídeos que codifica o peptídeo sinal da proteína GP64 (sinônimo de gp67) do AcMNPV, b) sequência de nucleotídeos que codificam rcaIL-7 com códons otimizados para a espécie de mariposa *Trichoplusia ni*; c) um espaçador de 23 aminoácidos, para expor a cauda de histidina, além de um elemento para favorecer a purificação: c) uma cauda de seis histidinas.

Devido ao fato de ser uma glicoproteína das mais abundante no envelope viral, a sequência líder de AcMNPV GP64 foi utilizada na construção o que facilita o processo de produção da proteína recombinante (WHITFORD et al., 1989). Além disso, a glicoproteína GP64 tem um papel importante no processo de penetração do vírus na célula e promoção da fusão da membrana endossomal com o envelope viral (CHARLTON & VOLKMAN, 1993; OOMENS; BLISSARD, 1999). A sequência líder encontra-se presente na extremidade da subunidade ribossomal maior no processo de tradução para síntese protéica e tem a capacidade de orientar o processo de produção para o retículo endoplasmático, assegurando que a proteína não seja liberada no citosol (ALBERTS et al., 2010 p.728).

Alguns estudos observaram que as construções de DNA com códons otimizados para uma espécie quando comparadas com as construções com sequência selvagem de DNA, tendem a gerar maior produção das proteínas codificadas em células homólogas (GUSTAFSSON et al., 2004; GAO et al., 2013). Previamente em nosso laboratório, construções de baculovírus recombinantes com inserto que codifica IL-12 e IL-2 contendo sequência líder para GP64 do AcMNPV, códons otimizados para *T. ni* e cauda

de histidina foram usadas para infectar células High-five e o rendimento foi de pelo menos 5 mg da proteína recombinante correspondente por litro de cultura, rendimento similar ao obtido para a proteína em estudo (rendimento médio de 5,5 mg/L).

Em geral, a cauda de histidina adicionada a proteínas recombinantes apresenta baixa imunogenicidade e raramente interfere na estrutura ou função da proteína alvo (CHAGA, HOPP, NELSON, 1999; GABERC-POREKAR; MENART, 2001). Em virtude disso e com objetivo de facilitar o processo de purificação da proteína por cromatografia de afinidade, a proteína rcaIL-7 foi produzida com uma cauda contendo 6 histidinas na extremidade carboxila.

A transposição de insertos clonados no plasmídeo carreador *pFastbac1* para o cromossoma artificial do baculovírus presente em *E. coli* da cepa DH10Bac Δ CC ocorre devido a bactéria possuir um plasmídeo auxiliador que codifica uma enzima (transposase). A transposase reconhece os sítios *Tn7L* e *Tn7R* do plasmídeo *pFastbac1* e o sítio *attTn7* no cromossoma artificial do baculovírus e, a partir daí transfere o segmento de DNA do plasmídeo para o bacmídeo (LUCKOW et al, 1993; MITRA et al., 2010).

Nesse trabalho, o plasmídeo carreador, contendo a construção de DNA que codifica IL-7 canina (proteína madura), foi usado para transformar *E. coli* da cepa DH10Bac Δ CC para a obtenção da transposição do segmento de DNA entre *Tn7L* e *Tn7R* do *pFastbac1* para cromossoma artificial do baculovírus com sucesso. Essa conclusão baseou-se no fato de que após a transformação foram observadas colônias brancas de *E. coli*. Além disso, a análise do produto da PCR realizada com uma amostra de bacmídeo extraído de uma colônia branca e oligonucleotídeos que flanqueiam os sítios *Tn7L* e *Tn7R* no cromossoma artificial de baculovírus revelou uma banda de DNA com ~3000 pb, compatível com a transposição.

O bacmídeo recombinante obtido foi utilizado para transfectar células de inseto para produção de estoques de baculovírus. O procedimento para amplificação viral mostrou-se bastante eficaz, uma vez que foi possível produzir, a partir de 2 mL de baculovírus gerados após transfecção (P1), com título TCID₅₀ de $5,62 \times 10^7$ /mL, 100 mL de um estoque viral amplificado (P2) com $3,99 \times 10^8$ /mL e a partir de 3 mL de P2 foi possível produzir 100 mL de um estoque viral amplificado, denominado P3, com $6,9 \times 10^8$ /mL.

Ocasionalmente, proteínas recombinantes produzidas no sistema baculovírus-células de inseto podem não ser secretadas eficientemente e/ou ser degradadas parcialmente no interior de células. Alguns autores sugerem a baixa eficiência da secreção ou degradação parcial de proteínas podem estar relacionadas a proteínas do vírus em

especial quitinase e catepsina e os produtos dos genes p26, p10 e p74 do vírus, que competem pelos recursos celulares envolvidos na secreção proteica ou exibem atividade proteolítica (HITCHMAN et al., 2009; HITCHMAN et al., 2010; KABA et al., 2004).

A linhagem de bactéria utilizada nesse trabalho (*E. coli* DH10Bac Δ CC, KABA et al., 2004) possui cromossoma artificial do baculovírus desprovido dos genes da quitinase (*chi*) e catepsina (*cath*). Dessa forma, o bacmídeo utilizado, em princípio, deveria favorecer a secreção de proteínas em células de inseto e contribuir para a integridade da proteína produzida. Apesar de não ter sido avaliada a produção de IL-7 dentro das células infectadas, o rendimento da proteína secretada e purificada, (5,6 mg/L de cultura; 4,5 mg/L e 6,48 mg/L para o 1º, 2º e 3º lotes, respectivamente) foi satisfatório para realização de estudos *in vitro* e, futuramente, *in vivo* e, além disso, não foi observada degradação protéica.

A análise das frações cromatográficas obtidas a partir de sobrenadante de células High-five infectadas com o baculovírus recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7*, cultivadas na ausência de tunicamicina, realizada por SDS-PAGE e *Western blot* revelaram três bandas de proteína com peso molecular maior que o peso predito para rcaIL-7 (18,7 kDa). Essas bandas de proteína, provavelmente, representam isoformas glicosiladas da proteína recombinante (SMITH et al., 1983; STILLES et al., 1983; SYDOW et al., 1996; SUN et al., 2002; KABA et al., 2004). Em ensaios realizados para avaliar a presença de N-glicosilação na proteína recombinante, as células High-five foram infectadas com o baculovírus recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* e cultivadas na presença de tunicamicina. Nesses ensaios, o sobrenadante de cultura apresentou um material precipitado após diálise contra PBS. Mesmo assim, as amostras das frações cromatográficas obtidas foram analisadas por SDS-PAGE. Tais frações cromatográficas mostraram três bandas de proteína de intensidade discreta com peso molecular de 13, 17 e 27 kDa. O encontro de material precipitado após a diálise e das bandas de proteína com intensidade discreta sugerem que o tratamento com tunicamicina promoveu a produção na forma denaturada e/ou resultou na redução da produção da proteína recombinante. Além disso, o desaparecimento das bandas de proteína 25 e 30 kDa pelo tratamento com tunicamicina sugere que pelo menos essas bandas correspondem a formas N-glicosiladas da rcaIL-7. A persistência da banda de proteína com 27 kDa indica que tunicamicina usada a 5 μ g/mL não foi suficiente para inibir completamente a N-glicosilação. As bandas menores de 13 e 17 kDa, possivelmente, correspondem a proteína parcialmente degradada e/ou não glicosilada. Um efeito indireto da tunicamicina em componentes de maquinaria

da célula envolvida na secreção poderia ser responsável pela redução na produção da proteína (VERNET et al., 1990). Dados da literatura sugerem que a glicosilação parece ter um importante papel na manutenção da estrutura, enovelamento, estabilidade e transporte das proteínas para a secreção no meio de cultura (KOBATA, 1992; WEERAPANA; IMPERIALI, 2006).

Treiber-held e colaboradores (1996) avaliaram a capacidade de IL-7 humana (rhuIL-7) recombinante de estimular a proliferação de linfócitos a partir de CMNSP homólogas. Nesses experimentos, os autores cultivaram CMNSP humanas por 1 a 19 dias na presença de rhuIL-7 a 100 ng/mL. Os autores observaram proliferação celular entre o terceiro e o décimo nono dia de cultivo, sendo o pico de proliferação detectado no sétimo e décimo dia. Curiosamente, esses autores também observaram proliferação celular de baixa intensidade quando as CMNSP foram cultivadas com de meio de cultura, sem estímulo adicional, entre os dias 7 e 11 do cultivo. A explicação para esse fato foi que ao longo da cultura algumas células morreram, foram fagocitadas, e células fagocíticas apresentaram antígenos a linfócitos sobreviventes. Previamente, em nosso laboratório, Paiva (2011) avaliou a capacidade de rcaIL-7 produzida em *Escherichia coli* de induzir proliferação celular quando incubada na concentração de 20 ng/mL por 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias com CMNSP de sete cães saudáveis. Nesse estudo, Paiva (2011) observou que CMNSP tratadas com IL-7 revelou aumento na incorporação de timidina tritiada entre o 8º e 12º dia de cultivo, sendo que o pico de proliferação detectado no 8º dia, comparadas com CMNSP cultivadas apenas com meio de cultura.

No presente trabalho, visando avaliar a atividade biológica da rcaIL-7 produzida no sistema baculovírus-células de inseto, a proteína recombinante foi incubada a 40 ng/mL com CMNSP de 8 cães saudáveis, por 5 e 7 dias. Antes do ensaio, as células foram marcadas com CFSE e depois do ensaio, a fluorescência correspondente a CFSE foi avaliada por citometria de fluxo. A comparação entre as células submetidas a tratamentos diferentes foi realizada pela determinação da porcentagem de células divididas (%D). Após 5 dias de cultivo a %D das CMNSP mantidas em meio com rcaIL-7 ou meio de cultura apenas foi de 2,85 e 7,42, respectivamente, o que corresponde a um aumento de 2,6 vezes da %D nas células tratadas com a proteína recombinante. A avaliação realizada no 7º dia de cultura mostrou um aumento de 1,7 da %D das CMNSP incubadas com rcaIL-7.

Os resultados encontrados indicam que a proteína recombinante produzida no sistema baculovírus células de inseto exibe atividade biológica. Além disso, com a

citocina rcaIL-7 produzida nesse trabalho, será possível realizar estudos de imunomodulação e avaliação de estabelecimento de uma resposta de longa duração em cães, os quais ainda não foram relatados na literatura. Reis e colaboradores (2005) descreveram um método baseado em citometria de fluxo adequado para a determinação de múltiplas subpopulações celulares em células de sangue periférico do cão, incluindo células T CD4+ e T CD8+ *naïve* (CD45RA) e de memória (CD45RB). Em breve, experimentos serão realizados com CMNSP de cães para determinação das subpopulações linfocitárias que são estimuladas a proliferar pelo uso dessa citocina.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos do presente trabalho podemos concluir que:

1. A citocina IL-7 canina recombinante (rcaIL-7) foi produzida e purificada com sucesso utilizando o sistema baculovírus célula de inseto;
2. A citocina IL-7 canina recombinante, produzida utilizando o sistema baculovírus célula de inseto, apresenta atividade biológica, estimulando a proliferação de células mononucleares de sangue periférico de cães saudáveis.

Com os resultados obtidos foi possível definir uma metodologia eficaz para a produção em larga escala de rcaIL-7 em sistema baculovírus células de inseto (*Baculovirus Expression System*).

8. PERSPECTIVAS

- 1) Avaliar a capacidade de rcaIL-7 de promover expansão de subpopulações de linfócitos B, linfócitos T CD4+, T CD8+, *naïve* (T CD4+CD45RA, T CD8+CD45RA) e monócitos de cães saudáveis e infectados com *Leishmania infantum*;
- 2) Avaliar o efeito biológico e toxicidade (sinais clínicos e parâmetros hematológicos) consequentes à administração de rca-IL-7 em cães.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed., Rio de Janeiro: Elsevier. 2008. 564p. ISBN 978-85-352-2244-9.
- AFONSO, L. C. C. et al. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. **Sciences, New series**, v. 263, n. 5144, p. 235-237, Jan. 1994.
- ALBERT, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2010. 728p.
- ALBUQUERQUE, P. L. et al. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceara, Brazil. **Rev. Panam. Salud. Publica**, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.
- ALPDOGAN, Ö.; VAN DEN BRINK, M. R.M. IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency. **Trends Immunol.** v. 26, n. 1, p. 56-64, 2005.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANTONIALLI, S. A. C. et al. Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. **J. infect.** v. 54, n. 5, p. 509-514, 2007.
- BANETH, G.; SHAW S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.** v. 106, n. 4, p. 315-324, 2002.
- BEERS, M. H.; BERKOW, R. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 1999. 17th. From <http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/section13/chapter161/161b.jsp>.
- BRADLEY, L. M.; HAYNES, L.; SWAIN, S. L. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. **Trends Immunol.** p. v. 26, n. 3, p.172-176. Mar. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. 120p.
- BOYMAN, O. et al. Cytokines and T-cell homeostasis. **Curr. Opin. Immunol.** v. 19, n. 3, p. 320-326, 2007.
- CABRERA, M.A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.
- CHA, H. J. et al. Purification of Human Interleukin-2 Fusion Protein Produced in Insect Larvae Is Facilitated by Fusion with Green Fluorescent Protein and Metal Affinity Ligand. **Biotechnol. Prog.** v. 15, n. 2, p. 283-286, 1999.
- CHAGA, G.; HOPP, J.; NELSON, P. Immobilized metal ion affinity chromatography on Co²⁺-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v.29, n. 1, p.19-24, 1999.

CHARLTON, C. A.; VOLKMAN, L. E. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLBSF21 cells induces action cable formation. **Virology**, v.197, p.245-254, 1993.

CIERI, N. et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naïve precursors. **Blood**, v. 121, n. 4, p. 573-584, 2013.

COLPITTS, S. L.; DALTON, N. M.; SCOTT, P. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62L^{high} central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. **J. Immunol.** v. 182, n.9, p. 5702-5711, 2009.

COOK, G. C. Leishmaniasis: some recent developments in chemotherapy. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 31, n.3, p. 327-330, 1993.

COSENZA, L.; SWEENEY, É.; MURPHY, J. R. Disulfide bond assignment in human interleukin-7 by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy and site-directed cysteine to serine mutational analysis. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 52, p. 32995-33000, 1997.

DAVIS, T. R. et al. Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.** v. 29, n. 5, p. 388-390, 1993.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 55, n. 2, p. 125-130, 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**, v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

FRY, T. J. et al. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. **Blood**, v. 97, n. 6, p. 1525-1533, 2001.

FRY, T. J. et al. IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2294-2299, 2003.

FRY, T. J.; MACKALL, C. L. Interleukin-7 and immunorestitution in HIV: beyond the thymus. **J. Hematother. Stem Cell Res.** v. 11, n. 5, p. 803-807, 2002.

GABERC-POREKAR, V.; MENART, V.. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. **J. Biochem. Bioph. Meth.** v. 49, n. 1, p. 335-360, 2001.

- GAO, J. et al. Codon optimization of the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) capsid gene leads to increased gene expression in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) cells. **J. Vet. Sci.** v. 14, n. 4, p.441-7, 2013.
- EGINAT, J.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human *naïve*, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. **J. Exp. Med.** v. 194, n. 12, p. 1711-1720, 2001.
- GHOSH, A.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v. 20, n. 1, p. 59-66, 2001.
- GRABSTEIN, K.H. et al. Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody. **J. Exp. Med.** v. 178, n. 1, p. 257- 264, 1993.
- GRADONI, L. et al. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. **Vaccine**, v. 23, n. 45, p. 5245-51, 2005.
- GRANADOS, R.R.; LI, G.; BLISSARD, G. W. Insect cell culture and biotechnology. **Virol. Sin.** v. 22, n. 2, p. 83-93, 2007.
- GUISEZ, Y. et al. High-level expression, purification, and renaturation of recombinant murine interleukin-2 from *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.** v. 4, n. 3, p. 240-246, 1993.
- GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends Immunol.** v. 22, n. 7, p. 346-53, 2004.
- HENNEY, C.S. Interleukin 7: effects on early events in lymphopoiesis. **Immunol. Today**, v. 10, n. 5, p. 170-173, 1989.
- HITCHMAN, R. B.; POSSEE, R. D.; KING, L. A. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells. **Recent. Pat. Biotechnol.** v. 3, n. 1, p. 46-54, 2009.
- HITCHMAN, R. B. et al. Improved expression of secreted and membrane-targeted proteins in insect cells. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 56, n. 3, p. 85-93, 2010.
- HOFMEISTER, R. et al. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. **Cytokine Growth Factor Ver.** v. 10, n. 1, p. 41-60, 1999.
- HUANG, C. J.; LOWE, A. J.; BATT C. A. Recombinant immunotherapeutics: current state and perspectives regarding the feasibility and market. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 87, n. 2, p. 401–410, 2010.
- JIANG, Q. et al. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. **Cytokine Growth Factor Ver.** v. 16, n. 4, p. 513-533, 2005.

- JERONIMO, S. M.B. et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 88, n. 4, p. 386-388, 1994.
- KABA, S. A. et al. Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins. **J. Virol. Methods.** v. 122, n. 1, p. 113-118, 2004.
- KAECH, S; M. et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. **Nature Immunol.** v. 4, n. 12, p. 1191-1198, 2003.
- KAUFMAN, H. L. et al. Insertion of interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes into vaccinia virus results in effective anti-tumor responses without toxicity. **Vaccine**, v. 20, n. 13, p. 1862-1869, 2002.
- KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.** v. 201, n. 1, p. 239-253, 2004.
- KIM, H. R. et al. IL-7 and IL-15: biology and roles in T-Cell immunity in health and disease. **Crit. Rev. Immunol.** v. 28, p. 325-39, n. 4, 2008.
- KOBATA, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. **Eur. J. Biochem.** v. 209, n. 2, p. 483-501, 1992
- KOMSCHLIES, K. L. et al. Administration of recombinant human IL-7 to mice alters the composition of B-lineage cells and T cell subsets, enhances T cell function, and induces regression of established metastases. **J. Immunol.** v. 152, n. 12, p. 5776-5784, 1994.
- 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**, v. 266, n.5603, p. 628-630, 1977.
- 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.** v. 81, n. 3, p. 517, 1987.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEE, S.K.; SURH, C.D. Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis. **Immunol. Rev.** v. 208, n.1, p. 169- 180, 2005.
- LENZ, D. C. et al. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+ T cell memory. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 101, n. 25, p. 9357-9362, 2004.
- LEVY, Y. et al. Effects of recombinant human interleukin 7 on T-cell recovery and thymic output in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: results of a phase I/IIa randomized, placebo-controlled, multicenter study. **Clin. Infect. Dis.** v. 55, n. 2, p. 291-300, 2012.

LUCKOW, V. A. et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J. Virol.**, v. 67, n. 8, p. 4566-4579, 1993.

MA, A.; KOKA, R.; BURKETT, P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 657-679, 2006.

MAEURER, M. J. et al. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect. Immun.** v. 68, n. 5, p. 2962-2970, 2000.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Públ.**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MAURICIO, I. L. et al. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology.** v. 119, n. 03, p. 237-246, 1999.

MAZZUCHELLI, R.; DURUM, S. K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. **Nat. Rev. Immunol.** v. 7, n. 2, p. 144-154, 2007.

MITRA, R. et al. Characterization of the TnsD-attTn7 complex that promotes site-specific insertion of Tn7. **Mob. DNA**, v. 1, n. 1, p. 1, 2010.

MOMEN, H.; GRIMALDI JUNIOR, G.; DEANE, L. M. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p.447-448, 1987.

MONIUSZKO, M. et al. Recombinant interleukin-7 induces proliferation of *naïve* macaque CD4+ and CD8+ T cells in vivo. **J. Virol.** v. 78, n. 18, p. 9740-9749, 2004.

MORENO, J. et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 71, n. 3, p. 181-195, 1999.

MORRISSEY, P. J. et al. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. **J. Exp. Med.**, v. 169, n. 3, p. 707-716, 1989.

MURRAY, H. W. Prevention of relapse after chemotherapy in a chronic intracellular infection: mechanisms in experimental visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** v. 174, n. 8, p. 4916-4923, 2005.

NAMEN, A. E. et al. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. **J. Exp. Med.** v. 167, n. 3, p. 988-1002, 1988.

NANJAPPA, S. G. et al. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. **J. Clin. Invest.** v. 118, n. 3, p. 1027-1039, 2008.

OOMENS, A.G.P.; BLISSARD, G.W. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. **Virology**, v. 254, n. 2, p. 297-314, 1999.

O'REILLY, D. R., MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. 4 ed., USA: Oxford University Press. 347p.

OUELLETTE, T. et al. Production and purification of refolded recombinant human IL-7 from inclusion bodies. **Protein Expr. Purif.** v. 30, n. 2, p. 156-166, 2003.

PAIVA, B. P. **Produção e avaliação dos efeitos biológicos de IL-7 e IL-15 caninas recombinante**. 2011. 83f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2011.

PAIXÃO, L.S. **Comparação de diferentes métodos para obtenção das citocinas caninas recombinantes IL-7 e IL-15 com atividade biológica produzidas em *Escherichia coli***. 2014. 70f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2014.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 55, n. 1, p. 39-44, 1996.

PARK, L.S. et al. Murine interleukin 7 (IL-7) receptor. Characterization on an IL-7-dependent cell line. **J. Exp. Med.** v. 171, n. 4, p. 1073-1089, 1990.

PELLEGRINI, M.; MAK T. W. Tumor immune therapy: lessons from infection and implications for cancer - can IL-7 help overcome immune inhibitory networks? **Eur. J. Immunol.** v. 40, n.7, p. 1852-1861, 2010.

PESCHON, J. J. et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. **J. Exp. Med.** v. 180, n. 5, p. 1955-1960, 1994.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.** v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.** v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.

PUEL, A. et al. Defective IL7R expression in T-B+ NK+ severe combined immunodeficiency. **Nature Genet.**, v. 20, n. 4, p. 394-397, 1998

QIU, G.F.; FENG, H.Y; YAMANO, K. Expression and Purification of Active Recombinant Cathepsin C (Dipeptidyl Aminopeptidase I) of Kuruma Prawn *Marsupenaeus japonicus* in Insect Cells. **Biomed. Res. Int.** v. 2009, n. 1-6, 2009.

RAMIRO, M. J. et al. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2474-2484, 2003.

RATHMELL, J. C. et al. IL-7 enhances the survival and maintains the size of *naïve* T cells. **The J. Immunol.** v. 167, n. 12, p. 6869-6876, 2001.

REIS, A. B. et al. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Vet. Immunol. Immunop.** v. 103, n. 3, p. 173-185, 2005.

RHALEM, A. et al. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 71, n. 1, p. 69-76, 1999.

SAKATA, T. et al. Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. **J. Leukoc. Biol.** v. 48, n. 3, p. 205-212, 1990.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - a Laboratory Manual.** 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHLUNS, K. S. et al. Interleukin-7 mediates the homeostasis of *naïve* and memory CD8 T cells in vivo. **Nat. Immunol.** v. 1, n. 5, p. 426-432, 2000.

SCHLUNS, K. S.; LEFRANÇOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. **Nat. Rev. Immunol.** v. 3, n. 4, p. 269-279, 2003.

SERETI, I. et al. IL-7 administration drives T cell–cycle entry and expansion in HIV-1 infection. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6304-6314, 2009.

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. Quart.** v. 19, n. 1, p. 10-13, 1997.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Mol. Cell. Biol.** v. 3, n. 12, p. 2156-2165, 1983.

SPORTÈS, C. et al. Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of *naïve* T cell subsets. **J. Exp. Med.** v. 205, n. 7, p. 1701-1714, 2008.

SPORTÈS, C. et al. Phase I study of recombinant human interleukin-7 administration in subjects with refractory malignancy. **Clin. Cancer. Res.** v. 16, n. 2, p. 727-735, 2010.

STILES, B.; WOOD, H. A.; HUGHES, P. R. Effect of tunicamycin on the infectivity of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **J. Invertebr. Pathol.** v. 41, n. 3, p. 405-408, 1983.

- SUDO, T. et al. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 90, n. 19, p. 9125-9129, 1993.
- STOREK, J. et al. Interleukin-7 improves CD4 T-cell reconstitution after autologous CD34 cell transplantation in monkeys. **Blood**. v. 101, n. 10, p. 4209-4218, 2003.
- SUN, S. et al. Expression, purification, and kinetic characterization of full-length human fibroblast activation protein. **Protein. Expr. Purif.** v. 24, n. 2, p. 274-281, 2002.
- SURH, C. D.; SPRENT, J. Homeostasis of *naïve* and memory T cells. **Immunity**, v. 29, n. 6, p. 848-862, 2008.
- SYDOW, S. et al. Overexpression of a functional NMDA receptor subunit (NMDAR1) in baculovirus-infected *Trichoplusia ni* insect cells. **Mol. Brain Res.** v. 41, n. 1, p. 228-240, 1996.
- TAKAHASHI, K.; HONEYMA, M. C.; HARRISON, L. C. Dendritic cells generated from human blood in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-7. **Hum. Immunol.** v. 55, n. 2, p. 103-116, 1997.
- TAKAHASHI, S. et al. High-level expression of recombinant active human renin in Sf-9 cells: rapid purification and characterization. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 71, n. 10, p. 2610-2613, 2007.
- TESH, R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 52, n. 3, p. 287-292, 1995.
- TREIBER-HELD, S. et al. Release of sIL-2R α from and activation of native human peripheral blood mononuclear cells by recombinant IL-15. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v. 80, n. 1, p. 67-75, 1996.
- TSCHANTZ, W. R. et al. Expression, purification and characterization of the human membrane transporter protein OATP2B1 from Sf9 insect cells. **Protein. Expr. Purif.** v. 57, n. 2, p. 163-171, 2008.
- VARAS, F.; BERNARD, A.; BUEREN, J. A. Restrictions in the stem cell function of murine bone marrow grafts after ex vivo expansion of short-term repopulating progenitors. **Exp. Hematol.** v. 26, n. 2, p. 100-109, 1998.
- VERNET, T. et al. Secretion of functional papain precursor from insect cells. Requirement for N-glycosylation of the pro-region. **J. Biol. Chem.** v. 265, n. 27, p. 16661-16666, 1990.
- VIVIEN, L.; BENOIST, C.; MATHIS, D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. **Int. Immunol.** v. 13, n. 6, p. 763-768, 2001.
- VON FREEDEN-JEFFRY, U. et al. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. **J. Exp. Med.** v. 181, n. 4, p. 1519-1526, 1995.

VILČEK, J.; FELDMANN, M. Historical review: cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 25, n. 4, p. 201-209, 2004.

YAMAKAMI, K. et al. A single intradermal administration of soluble leishmanial antigen and plasmid expressing interleukin-12 protects BALB_c mice from *Leishmania major* infection. **Parasitol. Int.** v. 50, n. 2, p. 81-91, 2001.

WANG, Y. et al. Expression, purification and characterization of recombinant mitochondrial topoisomerase II of kinetoplastid *Crithidia fasciculata* in High-five insect cells. **Protein. Expr. Purif.** v. 58, n. 1, p. 122-131, 2008.

WEERAPANA, E.; IMPERIALI, B. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. **Glycobiology**, v. 16, n. 6, p. 91R-101R, 2006.

WEI, C.; ZEFF, R.; GOLDSCHNEIDER, I. Murine pro-B cells require IL-7 and its receptor complex to up-regulate IL-7R alpha, terminal deoxynucleotidyltransferase, and c mu expression. **J. Immunol.** v. 164, n. 4, p. 1961-1970, 2000.

WILLIAMS, K. M.; HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. **Semin. Immunol.** v. 19, n. 5, p. 318-330, 2007.

WHITFORD, M. A. R. C. et al. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **J. Virol.** v. 63, n. 3, p. 1393-1399, 1989.

WHO. Technical Report Series. Control of Leishmaniasis. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2010.

APÊNDICE – ESBOÇO ARTIGO CIENTÍFICO

Título

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE IL-7 CANINA

Nome dos autores e Afiliações

Bárbara Maria Nascimento de Oliveira¹; Cristiane Garboggini Melo de Pinheiro²;
Geraldo Gileno de Sá Oliveira²

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa,

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil

²Centro de pesquisa Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz

*Autor correspondente

Bárbara Maria Nascimento de Oliveira

Geraldo Gileno de Sá Oliveira

Laboratório de Patologia e Biointervenção, CPqGM, FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal

Salvador/BA, Brazil; CEP 40296-710

Fax: + 55 (71) 3176-2257

E-mail: barbaraoliveira_mev@yahoo.com.br; ggileno@bahia.fiocruz.br

*Endereço de email dos autores

cpinheiro@posdoc.bahia.fiocruz.br

ggileno@bahia.fiocruz.br

barbaraoliveira_mev@yahoo.com.br

Resumo

INTRODUÇÃO. A interleucina 7 (IL-7) é uma citocina pleiotrópica produzida principalmente por células estromais da medula óssea, células epiteliais tímicas e intestinais. IL-7 é que promove o desenvolvimento de linfócitos T e B e diferenciação de células T memória, especialmente CD4⁺. Por isso, diversos autores têm estudado a

33 capacidade de IL-7 promover a restauração da população de linfócitos em situações de
34 linfopenia e resposta imune de memória. Cães que desenvolvem leishmaniose visceral e
35 recebem tratamento específico apresentam cura clínica. No entanto, após a interrupção do
36 tratamento, a maioria dos animais exibe recaída da doença, mesmo na ausência de re-
37 infecção. É possível que esse fenômeno esteja associado a uma dificuldade de
38 estabelecimento de linfócitos T de memória específicos para *Leishmania* em cães. Em
39 nosso laboratório, tentativas prévias foram realizadas para produzir a IL-7 canina em
40 *Escherichia coli*, no entanto, o rendimento da proteína biologicamente ativa foi pequeno.
41 OBJETIVO. Por isso, resolveu-se avaliar a viabilidade de produzir IL-7 do sistema
42 baculovírus-células de inseto. MATERIAL E MÉTODOS. No presente trabalho, uma
43 construção de DNA foi concebida contendo uma sequência de nucleotídeos que
44 codificam o peptídeo sinal da proteína GP64 do baculovírus da *Autographa californica*
45 (AcMNPV), a IL-7 canina (proteína madura) com códons otimizados para a tradução em
46 *Trichoplusia ni*, um espaçador com 23 aminoácidos e uma cauda de seis histidinas. A
47 construção de DNA elaborada foi sintetizada quimicamente, inserida em um plasmídeo
48 de clonagem (*pUC57-GP64caIL-7*), subclonada em um plasmídeo carreador (*pFastBac1-*
49 *GP64caIL-7*), adequado para o sistema baculovírus-célula de inseto, e transferida para o
50 cromossoma artificial do baculovírus recombinante (bacmídeo). RESULTADOS. A
51 produção de IL-7 recombinante canina (*rcaIL-7*) em células de inseto infectadas com
52 baculovírus recombinante foi otimizada. Em seguida, a *rcaIL-7* foi produzida em células
53 High-five cultivadas em suspensão utilizando multiplicidade de infecção (MOI) de 5 e
54 tempo de infecção (TOI) de 48 h. A proteína recombinantes foi purificada por
55 cromatografia de afinidade em Sepharose-níquel, obtendo-se um rendimento médio de
56 5,5 mg por litro de cultivo. CONCLUSÃO. *RcaIL-7* purificada, avaliada a 40 ng/mL,
57 mostrou-se capaz de promover a proliferação de células mononucleares de sangue
58 periférico de cães saudáveis, sem estímulo prévio ou concomitante, indicando que a proteína
59 foi produzida biologicamente ativa. Futuros estudos serão realizados para avaliar a
60 capacidade imunomoduladora da *rcaIL-7* em cães e determinar a utilidade dessa citocinas
61 no tratamento de enfermidades caninas, como por exemplo, na leishmaniose visceral
62 canina.

63

64 **Palavras-chave:** Interleucina 7; células mononucleares; cão.

65

66

67 **Introdução**

68 A interleucina 7 (IL-7) é uma glicoproteína essencial para o desenvolvimento e
69 sobrevivência de linfócitos. Descoberta em 1988 como um fator hematopoiético que
70 promovia proliferação de células progenitoras da linhagem linfocitária B em um sistema
71 de cultura de medula óssea, a IL-7, ficou conhecida como linfopoiética-1 (NAMEN et
72 al., 1988).

73 A IL-7 é secretada por células do estroma da medula óssea, bem como células
74 epiteliais tímicas e intestinais (SAKATA et al., 1990; MAZZUCHELLI; DURUM,
75 2007). Além disso, algumas células mononucleares, incluindo as células dendríticas e os
76 macrófagos também produzem IL-7 (JIANG et al., 2005). A IL-7 promove proliferação
77 e diferenciação de células da linhagem T e B no timo e na medula óssea, respectivamente
78 (WEI et al., 2000).

79 Os efeitos da IL-7 são mediados através do seu receptor (IL-7R). O receptor para
80 IL-7 é um complexo dimérico que inclui, pelo menos, duas subunidades: a cadeia α IL-
81 7R (IL-7R α), também conhecida como CD127, e a cadeia γ comum IL-7R (IL-7R γ),
82 também referida como CD132 (SUDO et al.; 1993; SCHLUNS; LEFRANÇOIS, 2003;
83 MAZZUCHELLI; DURUM, 2007), a qual também é partilhado por outros receptores
84 de citocinas, incluindo IL-2, IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21 (BOYMAN et al., 2007). Estudos
85 têm sugerido que as interações impedindo a ligação de IL-7 e seu receptor IL-7R podem
86 perturbar a homeostase da célula T em órgãos linfóides periféricos, mostrando efeito
87 sobre a imunidade adaptativa (HOFMEISTER et al., 1999; LEE; SURH, 2005).

88 A primeira evidência de que a citocina IL-7 tem papel na linfopoiese veio a partir
89 da utilização de anticorpo anti-IL-7 em camundongo, levando a interrupção no
90 desenvolvimento de ambas células T e B (GRABSTEIN et al., 1993). Estudos têm
91 sugerido que as interações impedindo a ligação de IL-7 e seu receptor IL-7R podem
92 perturbar a homeostase da célula T em órgãos linfóides periféricos, mostrando efeito
93 sobre a imunidade adaptativa (HOFMEISTER et al., 1999; LEE; SURH, 2005).

94 Foi observado que a IL-7 desempenhou um papel importante na sobrevivência do
95 compartimento de células T *naïve*, especialmente de células T CD4+. Essas células,
96 curiosamente, expressam níveis mais elevados de IL-7R α do que as células T CD8+ e
97 parecem ser mais dependentes de sinalização derivada de IL-7 para sobrevivência
98 (VIVIEN et al., 2001). Além disso, células T maduras e inexperientes cultivadas na
99 ausência de IL-7 exibem um tamanho celular pequeno, baixo metabolismo de glicólise e
100 resposta retardada a estímulos mitogênicos (RATHMELL et al., 2001). Por ser uma

101 citocina envolvida na regulação da hematopoiese, que atua principalmente sobre
102 compartimento de célula linfóide (HENNEY, 1989), a IL-7 é capaz de estimular
103 sinalização para sobrevivência de células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas além de participar na
104 diferenciação de células T de memória in vivo por ligação à IL-7R α sobre estas células
105 (MA et al., 2006).

106 Em um estudo de fase I, Sereti e colaboradores (2009) avaliaram as propriedades
107 biológicas e segurança farmacológica de IL-7 em pacientes infectados pelo HIV (vírus da
108 imunodeficiência humana). Uma única dose de rhIL-7 é bem tolerada, variando de 3 a 60
109 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e segundo os autores tende a promover um aumento do número de células T CD4⁺
110 e CD8⁺ circulantes, predominantemente do fenótipo de memória central. Já em um estudo
111 de fase I/IIa, onde avaliou-se os mecanismos de restauração de células T com terapia
112 rhIL-7 em pacientes infectados pelo HIV recebendo terapia anti-retroviral. Os autores
113 utilizaram doses de rhIL-7, de 10, 20 e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e parâmetros como toxicidade, atividade
114 e o impacto da rhIL-7 na reconstituição imunológica foram monitorados. Nesse estudo
115 foi observado que doses de rhIL-7 de até 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foram bem toleradas, e que a rhIL-7
116 aumentou predominantemente o número de células T CD4⁺ de memória central e *naïve*
117 e subpopulações de células T CD8⁺ (LÉVY et al., 2012).

118 O uso dessa citocina vem recebendo a atenção de muitos pesquisadores que
119 passaram a avaliar experimentalmente o uso de IL-7 em diversas condições, como por
120 exemplo, no controle de neoplasias, na reconstituição de células T necessária após
121 quimioterapia e radioterapia (WILLIAMS et al., 2007), na promoção de respostas imunes
122 no curso de doenças infecciosas, na geração de resposta imune de maior intensidade e de
123 longa duração, como agente adjuvante (COLPITTS et al., 2009; NANJAPPA et al., 2008)
124 ou como agente imunoterápico (MAEURER et al., 2000; PELLEGRINI; MAK, 2010).

125 Até o presente momento, ainda não foram descritas na literatura científica a
126 produção, avaliação de atividades biológicas, utilidade na modulação da resposta imune
127 ou geração de células de memória da citocina IL-7 canina. Nossa hipótese é que a IL-7
128 recombinante canina (rcaIL-7) produzida no sistema eucarioto na forma solúvel possui
129 atividade biológica.

130 Visando a avaliação, em um futuro próximo, da utilidade de IL-7 canina em um
131 método imunoterápico para LV canina, no presente trabalho, foram descritas a obtenção
132 da construção de DNA codificante, a subclonagem, a produção e purificação bem como
133 a avaliação de atividade biológica da IL-7 canina.

134 **Metodologia**

135 **Construção IL-7 canina**

136 A construção de DNA foi concebida para a produção da IL-7 canina na forma
137 secretada no sistema baculovírus-células de inseto. Para isso, elementos com grande
138 capacidade de promover a secreção ou a tradução da proteína, foram utilizados como: a)
139 a sequência líder da proteína GP64 (sinônimo de gp67) do vírus da polihedrose nuclear
140 múltipla da *Autografa californica* (AcMNPV) (WHITFORD et al., 1989), b) a IL-7
141 canina (proteína madura) (Genebank, número de acesso DQ845341), c) um espaçador de
142 23 aminoácidos, para expor a cauda de histidina, além de um elemento para favorecer a
143 purificação: c) uma cauda de seis histidinas (Figura 1). A construção de DNA foi
144 elaborada com códons otimizados para os elementos “a” (a partir do terceiro códon), “b”,
145 “c” e “d” para a tradução em *Trichoplusia ni*, sintetizada quimicamente e subclonada no
146 plasmídeo *pUC57* pela empresa GenScript (Piscataway, EUA), dando origem a
147 construção plasmideal denominada *pUC57-GP64caIL-7*. Em nosso laboratório, foi
148 realizada a subclonagem do inserto *GP64caIL-7* da construção plasmideal *pUC57-*
149 *GP64caIL-7* para o plasmídeo *pFastBac1* (Invitrogen, Carlsbad, EUA), adequado para o
150 sistema baculovirus-célula de inseto, gerando a construção *pFastBac1-GP64caIL-7*.

151 Para confirmar o sucesso da subclonagem, amostras da construção *pFastBac1-*
152 *GP64caIL-7* foram submetidas à digestão pelas enzimas *SalI* e *NotI* (Thermo Fisher
153 Scientific) e análise em gel de agarose corado com brometo de etídio, seguindo-se um
154 método convencional (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

155 **Manutenção de células de inseto**

156 Células do inseto das linhagens de Sf9 (derivadas da *Spodoptera frugiperda*,
157 Invitrogen) e BTI-TN-5B1-4 (derivadas da *Trichoplusia ni* e comercializadas sob o nome
158 de High-five, Invitrogen) foram utilizadas. As células Sf-9 foram mantidas em meio de
159 cultura TNM-FH (Sigma-Aldrich) com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen), 10 µg/mL
160 de sulfato de gentamicina (TNM-FH completo) (Sigma-Aldrich) com (cultivo de células
161 em suspensão) ou sem (cultivo de células aderentes) Pluronic F-68 a 0,1% (v/v) (Sigma-
162 Aldrich). As células High-five foram cultivadas em meio Express-five sem soro bovino
163 fetal (SFM) (Invitrogen), suplementado com 18 mM de L-glutamina (Invitrogen) e 10
164 µg/mL de sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich). As culturas de células foram mantidas
165 a 27 °C, quer como uma monocamada ou em suspensão em frascos de agitação, de acordo
166 com as instruções do fabricante.

167 **Geração de baculovírus que codifica IL-7 canina**

168 A transposição do inserto da construção plasmídeoal *pFastBac1-GP64caIL-7* para
169 o bacmídeo (cromossoma artificial do baculovírus que contém elementos do plasmídeo
170 mini-F) foi realizada pela transformação de bactéria *Escherichia coli* da cepa
171 DH10AcBac Δ CC (gentilmente doada pela Dra. Monique M. van Oers, Laboratório de
172 Virologia, Universidade de Wageningen, Holanda), conforme método descrito por
173 Luckow e colaboradores, 1993. A cepa DH10AcBac Δ CC contém um bacmídeo do
174 AcMNPV [deficiente nos genes da catepsina (*cath*) e da quitinase (*chi*)] e um plasmídeo
175 auxiliar que codifica uma transposase (KABA et al., 2004). Para obtenção de bacmídeo
176 controle negativo, a cepa de *E. coli* DH10AcBac Δ CC quimicamente competente foi
177 transformada com o plasmídeo *pFastBac1* vazio. Esses controles foram obtidos por
178 transposição do segmento de DNA entre *Tn7R* e *Tn7L* do plasmídeo *pFastBac1* para o
179 bacmídeo. Amostras de bacmídeo contendo a construção *GP64-caIL-7* ou segmento de
180 DNA do *pFastBac1* vazio foram usadas para transfectar células Sf9 (Invitrogen)
181 cultivadas em monocamada, utilizando-se lipofectamina, conforme recomendações do
182 fabricante (Invitrogen). Seis dias após a transfecção, suspensões de cultura de células SF9
183 foram centrifugadas a 500 x g durante 5 minutos e os sobrenadantes resultantes (estoques
184 virais) foram armazenadas a 4 °C, protegidas da luz. Para se obter estoques virais de título
185 elevado, cultura de células Sf-9 em suspensão, fase logarítmica de crescimento, (2×10^6
186 / ml) foram infectadas a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1, quer durante 72
187 horas ou até que a viabilidade celular diminuísse para cerca de 75%, e, em seguida, cada
188 a suspensão celular foi centrifugada a 130 x g por 5 minutos a 4 °C, e cada sobrenadante
189 foi armazenado a 4 °C, protegido da luz. Os estoques de baculovírus foram titulados
190 usando o ensaio de diluição de ponto final (O'REILLY et al., 1994).

191 **Ensaio de otimização da produção de proteína recombinante**

192 Células High-five (1×10^6 / poço) cultivadas em monocamadas em meio isento
193 de soro em placas de titulação com 6 poços foram infectadas com as construções de
194 baculovírus recombinantes *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* usando-se MOI de 2, 5 ou 10 e com
195 vírus *AcBac Δ CC-pFastBac1* utilizando-se MOI 10. Para avaliar a proteína recombinante
196 segregada, os sobrenadantes de cultura de células foram coletados com 24, 48 ou 72 horas
197 após a infecção, centrifugados a 200 x g, por 5 minutos, e os sobrenadantes isento de
198 células foram armazenadas a 20 °C até à sua utilização. A avaliação da IL-7 no
199 sobrenadante de cultura foi realizada pela técnica de *dot blot* utilizando-se para isso um

200 anticorpo monoclonal de camundongo anti-histidina, um conjugado a fosfatase alcalina,
201 conforme descrito abaixo.

202 ***Dot-Blot***

203 Para os ensaios de dot-blot, uma membrana de nitrocelulose foi colocada num
204 dispositivo de absorção de 96 poços (*blotter*, Bio-Rad Laboratories). Depois disso, 150
205 μL de cada sobrenadante obtido de cultura de células High-five, inoculadas com
206 baculovírus *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* (MOI 2, 5 ou 10) ou *AcBac Δ CC-pFastBac1* (MOI
207 10) e cultivadas em diferentes tempos de infecção (TOI) de 24, 48 ou 72 h, foram usados
208 para impregnar áreas circulares da membrana de nitrocelulose, correspondentes ao fundo
209 de poços do aparelho de impregnação, pela aplicação de vácuo. A membrana de
210 nitrocelulose foi retirada do aparelho e bloqueada com leite desnatado a 5 % em salina
211 tamponada com Tris, pH 7,5, e Tween 20 a 0,05 % (v/v) (TBS-T-L), incubada com
212 anticorpo anti-histidina, extremidade c-terminal (R93025, Invitrogen), diluído 1:5000 e
213 com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo (IgA, IgM e IgG) conjugados a
214 fosfatase alcalina (Sigma Aldrich), diluídos de 1:500 em TBS-T-L. A membrana foi
215 revelada pela adição de substrato a fosfatase alcalina (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
216 e nitro azul de tetrazólio, Sigma Aldrich).

217 **Produção de IL-7 canina recombinante por células High-Five**

218 A produção de IL-7 recombinante canina em células High-Five foi realizada em
219 volumes de 50 a 100 mL, usando meio de cultura completo Express-Five-SFM. Para isso,
220 células High-five em fase logarítmica de proliferação cultivadas em suspensão na
221 concentração $2 \times 10^6/\text{mL}$, foram infectadas com *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* a MOI 5. Em
222 um dos frascos de cultura, tunicamicina (Sigma-Aldrich) foi adicionada para alcançar
223 uma concentração de $5 \mu\text{g}/\text{mL}$, com objetivo de determinar a presença de N-glicosilação
224 na proteína recombinante produzida. Após 48 horas, cada suspensão celular foi
225 centrifugada a $3.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C . Os sobrenadantes resultantes foram
226 centrifugados a $30.000 \times g$, por 1 hora a 4°C , para remoção das partículas virais e, m
227 seguida, armazenados a -70°C até o momento do uso. Os sobrenadantes livre de vírus
228 foram submetidos à diálise contra solução salina tamponada com fosfato PBS (NaCl a
229 137 mM , KCl a $2,68 \text{ mM}$, Na_2HPO_4 a $9,58 \text{ mM}$ e NaK_2PO_4 a $1,47 \text{ mM}$, pH 7,4), pela
230 aplicação de 2-3 banhos diários, por até 2 dias e, em seguida, receberam imidazol para
231 atingir a concentração final de 30 mM . Além disso, um dos lotes recebeu NaCl para
232 alcançar a concentração de $0,5 \text{ M}$.

233 A proteína recombinante foi purificada de 3 lotes de sobrenadante de cultura por
234 cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna Sepharose quelada com níquel
235 (coluna HisTrap HP, General Electric's Healthcare, Piscataway, EUA). A coluna
236 cromatográfica foi equilibrada com PBS com imidazol a 30 mM ou PBS com imidazol a
237 30 mM e NaCl a 1 M. Os sobrenadantes dialisados foram aplicados à coluna. A coluna
238 foi lavada com PBS com imidazol a 30 mM ou PBS com imidazol a 30 mM e NaCl a 1
239 M. A coluna foi eluída com PBS com NaCl a 1 M e um gradiente contínuo de imidazol
240 de 30 a 500 mM ou com PBS e imidazol a 500 mM, seguindo as recomendações do
241 fabricante. Para avaliar a presença de N-glicosilação na proteína recombinante,
242 sobrenadante de cultura de células High-five obtidas na presença de tunicamicina foi
243 submetido à purificação conforme descrito previamente.

244 As frações contendo a proteína recombinante foram submetidas à troca de tampão
245 para PBS através de diálise ou da coluna cromatográfica de gel filtração (His-Trap
246 Desalting, General Electric's Healthcare) e armazenadas a - 70 ° C até à sua utilização.
247 Uma alíquota de cada lote produzido na ausência de tunicamicina foi submetida à
248 determinação da concentração protéica, pelo método do ácido bicinconínico (Micro BCA
249 protein assay kit, Thermo Fisher Scientific), assim como para avaliação quanto à presença
250 de endotoxinas (lipolissacarídeos, LPS) (Charles River Endosafe[®], Charleston, SC,
251 EUA).

252 **SDS-PAGE e *Western blot***

253 A análise da proteína recombinante canina (rcaIL-7) produzida no sistema
254 baculovírus célula de inseto (BEVS) e/ou purificada por cromatografia de afinidade foi
255 feita por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)
256 e *Western blot* utilizando o sistema de gradiente descontínuo com gel de separação a 12
257 ou 15 %, conforme método previamente descrito (LAEMMLI, 1970).

258 Foram aplicadas e avaliadas em gel de poliacrilamida amostras referentes à
259 purificação de rcaIL-7 na ausência de Tunicamicina: a) amostra aplicada na coluna
260 (afluente); b) material que não se prendeu à coluna (efluente); c) frações de eluição
261 contendo a proteína rcaIL-7 purificada. Foram aplicadas em gel para análise por *Western*
262 *blot*: a) sobrenadante de células High-Five infectadas com baculovírus recombinante
263 *AcBacΔCC-GP64caIL-7* e, a proteína purificada por cromatografia de afinidade, b) rcaIL-
264 7 (2 µg); c) rcaIL-7 (1 µg).

265 Para a realização do *Western blot*, foi utilizado o método de transferência úmido em
266 um aparelho *transblotter* da BIO-RAD (BIO-RAD, Hercules, EUA) para a transferência
267 das proteínas do gel de poliacrilamida para membrana nitrocelulose, seguindo-se as
268 instruções do fabricante. Resumidamente, foi preparado um Sandwich com papel de
269 filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulose e papel de filtro umedecido com
270 tampão Tris [Tris a 24 mM, glicina a 192 mM, metanol a 20 % (v/v), 0,1% SDS, pH 8.3].
271 O Sandwich foi colocado no aparelho de transferência e foi aplicada uma corrente elétrica
272 de 200 mA por 16-18h a 25 °C. Depois disso, a membrana foi corada com vermelho de
273 Ponceau [Ponceau S a 0,1 % (m/v) e ácido acético a 5 % (m/v)] para identificação das
274 raias. A revelação de proteína com cauda de histidina na membrana de nitrocelulose foi
275 realizada conforme método descrito para o ensaio de “dot-blot”.

276 **Ensaio biológico de rcaIL-7 utilizando células mononucleares de sangue** 277 **periférico de cães sadios**

278 Amostras de sangue periférico coletados de oito cães adultos (3 machos e 5
279 fêmeas), sadios, sem raça definida, com idade entre 4-7 anos foram utilizados. Estes
280 animais obtidos do Centro de Controle de Zoonose (CCZ) ou doados por proprietários
281 particulares ainda filhotes. Os experimentos foram realizados em conformidade com as
282 orientações da Fundação Oswaldo Cruz para o uso de animais de laboratório e aprovado
283 pelo Comitê de Ética de Pesquisas Gonçalo Moniz Center (licença protocolo 021/2011-
284 CPqGM).

285 Resumidamente, as PBMC purificadas por gradiente de densidade de Ficoll-
286 PaqueTMPlus® (GE Healthcare, EUA). Cada sedimento celular foi ressuspensão com 10
287 mL de solução salina estéril. Uma alíquota de cada suspensão foi utilizada para contagem
288 das células, usando-se azul tripan a 0,04 % e uma câmara de Neubauer. Cerca de 1×10^7
289 células/mL CMNSP de cada cão foram ressuspensas em 2 mL de PBS com *albumina*
290 *sérica bovina* (BSA) a 0,1% em (m/v). Em seguida, carboxifluoresceína diacetato
291 succinimidil ester (CFSE) (CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen) a 5 μ M
292 foram adicionados a cada suspensão celular. Posteriormente, as células de cada cão foram
293 ajustadas para a concentração de 2×10^6 /mL com de cultura RPMI (Sigma-Aldrich)
294 suplementado com 10 mM de HEPES (pH 7,0), 10 % de soro bovino fetal (SBF,
295 Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 10 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-
296 Aldrich) e 50 μ g/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) (meio RPMI completo). Em uma
297 placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning), foram colocadas 2×10^5 CMNSP

298 por poço. Em duplicata de poços, as células de cada cão foram cultivadas apenas com
299 meio de cultura RPMI completo ou RPMI completo com fitohemaglutinina (PHA, Sigma-
300 Aldrich) a 6 µg/mL e rcaIL-7 a 40 ng/mL.

301 Células não marcadas com CFSE foram utilizadas como controle do experimento.
302 As placas foram incubadas por 5 e 7 dias a 37 °C com 5 % de CO₂. Depois disso, a
303 suspensão celular de cada duplicata de poços foi coletada e misturada em um único tubo
304 de poliestireno e 2 mL de PBS (m/v) foram adicionados aos tubos. As células foram
305 centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células
306 foram fixadas com formaldeído a 1 % em PBS (m/v) e mantidas à 4 °C para posterior
307 leitura em Citômetro de Fluxo (LSRFortessa BD, San Jose, EUA), onde se analisou um
308 total de 10.000 eventos por aquisição/amostra.

309 **Análise de proliferação celular por Citometria de Fluxo**

310 As subpopulações celulares foram identificadas através das propriedades de
311 dispersão frontal de luz (FSC) e dispersão lateral de luz (SSC) que permitem a avaliação
312 do tamanho e a granulosidade, respectivamente. Para isso, foi utilizado um Citômetro de
313 Fluxo, sendo os eventos obtidos por meio de um programa de computador (FACSDiva
314 BD, v.6.1.3, San Jose, EUA). A fluorescência de linfócitos marcados com CFSE foi
315 detectada usando-se um filtro FL-1 (488 nm). Antes da aquisição de eventos, o citômetro
316 foi calibrado com células não marcadas. Os dados obtidos foram analisados através do
317 programa FlowJo (versão 7.6, Tree Star, Ashland, EUA). O índice de divisão celular e a
318 porcentagem de células divididas foram determinados pelo programa FlowJo.

319 **Análise estatística**

320 A avaliação do efeito proliferativo promovido pela rcaIL-7 foi feita por ANOVA
321 seguido do pós-teste Tukey. O valor de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. O
322 programa GraphPad Prism (San Diego, EUA), versão 5.0, foi utilizado para as análises

323 **Resultados**

324 Para a obtenção do bacmídeo recombinante foi utilizada uma construção de DNA
325 previamente concebida e sintetizada quimicamente pela GenScript (Figura 1).

326

327 **Subclonagem da construção de DNA *GP64caIL-7* do plasmídeo pUC57 para o**
328 **plasmídeo *pFastBac1***

329 Para avaliar o sucesso da subclonagem, amostras de plasmídeo obtidas de 10 colônias
330 (clones) de *E. coli* DH5alfa transformada com o produto de ligação entre o inserto
331 *GP64caIL-7* e *pFastBac1* foram submetidas a digestão enzimática (*Sal I* e *Not I*) e
332 eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Plasmídeo proveniente de
333 7 dos 10 clones examinados apresentaram duas bandas de DNA com cerca de 4755 e 622
334 pares de bases (bp), compatíveis com o plasmídeo *pFastBac1* sem o segmento do sítio
335 múltiplo de clonagem e a construção *GP64caIL-7* (Figura 2), sugerindo que a
336 subclonagem foi realizada com sucesso.

337 **Transposição do segmento de DNA entre *Tn7L* e *Tn7R* da construção**
338 **plasmideal *pFastBac1-GP64caIL-7* para o cromossoma artificial do baculovirus**

339 Para confirmar a transposição do segmento de DNA entre *Tn7L* e *Tn7R*, que inclui o
340 inserto *GP64caIL-7*, para o cromossoma artificial do baculovírus, uma amostra de
341 bacmídeo extraído de uma colônia branca de *E. coli* DH10BAC Δ CC transformada com a
342 construção plasmideal *pFastBac1-GP64caIL-7* e fenótipo confirmado foi usada como
343 molde para PCR. A PCR foi realizada com oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam
344 os sítios *Tn7L* e *Tn7R* do bacmídeo. O produto da PCR, avaliado por eletroforese em gel
345 de agarose, mostrou uma banda de DNA com aproximadamente 3.000 pb (Figura 3),
346 correspondente ao segmento de DNA transferido do *pFastBac1* (2300 pb) contendo o
347 inserto *GP64caIL-7* (635 pb), o que indica que a transposição e obtenção do bacmídeo
348 recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* foi realizada com sucesso.

349 **Obtenção de estoque viral para a produção de proteína recombinante**

350 Os sobrenadantes de cultura resultantes da transfecção (P1) e da amplificação viral
351 (P2 e P3) foram titulados, pelo ensaio de diluição limitante. Os estoques P1, P2 e P3 do
352 vírus recombinante exibiram o título TCID₅₀ de 1×10^6 /mL, $6,6 \times 10^7$ /mL e $6,9 \times 10^8$ /mL,
353 respectivamente.

354 **Produção da *rcaIL-7***

355 Visando determinar as melhores condições para produção da proteína
356 recombinante em sobrenadante de cultura de células de inseto, células High-five foram
357 inoculadas com baculovírus recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7* usando-se MOI 2, 5

358 e 10 e amostras de sobrenadante foram avaliadas após 24, 48 e 72 h. Sobrenadante de
359 células High-five inoculadas com baculovírus *AcBacΔCC-pBastBac1* com MOI 10 foi
360 usado como controle negativo. A avaliação de sobrenadante de cultura foi realizada pela
361 técnica de *dot blot* utilizando-se para isso um anticorpo monoclonal de camundongo anti-
362 histidina, um conjugado a fosfatase alcalina.

363 No ensaio *dot blot*, a membrana de nitrocelulose não exibiu sinal significativo
364 quando foi usado sobrenadante de 24, 48 ou 72 h (TOI) de cultura com células infectadas
365 com baculovírus *AcBacΔCC-pBastBac1* (controle negativo) com MOI 10 ou
366 sobrenadante de 24 h de cultura com células infectadas com baculovírus recombinante
367 *AcBacΔCC-GP64caIL-7* com MOI 2 (Figura 4). Entretanto, a membrana de nitrocelulose
368 revelou sinal progressivamente maior quando foi usado sobrenadante de cultura de
369 células infectadas com *AcBacΔCC-GP64caIL-7* com MOI 5 e TOI 24 h, MOI 10 e TOI
370 24 h, MOI 2 e TOI 48 h, e MOI 5 e TOI 48 h. O sinal observado para sobrenadante de
371 cultura de células infectadas com *AcBacΔCC-GP64caIL-7* com MOI 5 e TOI 48 h e MOI
372 10 e TOI 48 h foi semelhante. Esse último sinal foi maior que o apresentado para MOI 2
373 e TOI 72 h, MOI 5 e TOI 72 h ou MOI 10 e TOI 72 h (Figura 4). A partir desses resultados,
374 a condição de MOI 5 e TOI 48 h foi escolhida para a produção da *rcaIL-7*.

375 **Avaliação da produção e purificação da *rcaIL-7***

376 Para a produção da proteína recombinante, células High-five cultivadas em
377 suspensão foram inoculadas com MOI 5 e por 48 h e, depois disso, o sobrenadante livre
378 de células e de partículas virais foi dialisado contra PBS. A proteína presente no
379 sobrenadante dialisado foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade em
380 coluna Sepharose-níquel. A análise das frações cromatográficas livres de proteínas
381 contaminantes realizada por SDS-PAGE e gel corado por azul de Coomassie mostrou
382 duas bandas moderadamente largas com peso molecular médio de 27 e 30 kDa e uma
383 banda com tamanho médio de 25 kDa (Figura 5A, raias 7, 8 e 9), que possivelmente
384 representam isoformas glicosiladas da *rcaIL-7*. Como o peso molecular predito para
385 proteína recombinante desprovida da sequência líder é de 18,7 kDa, para avaliar a
386 presença de N-glicosilação, que justificasse o encontro de bandas com maior peso
387 molecular, células High-five foram infectadas com baculovírus recombinante
388 *AcBacΔCC-GP64caIL-7* com MOI 5 e TOI 48 h em meio de cultura com 5 µg/mL de
389 tunicamicina. Depois disso, o sobrenadante obtido foi dialisado contra PBS e submetido
390 à purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-níquel.

391 Curiosamente, após a diálise, observou-se a formação de um material precipitado de
392 coloração esbranquiçada (dados não mostrados), fato não ocorrido com o sobrenadante
393 de células High-five infectadas com baculovírus recombinante *AcBacΔCC-GP64caIL-7*
394 obtido na ausência de tunicamicina. A análise das frações cromatográficas livres de
395 proteínas contaminantes em gel de poliacrilamida corado por azul de Coomassie, mostrou
396 em conjunto 3 bandas, com peso molecular de cerca de 13, 17 e 27 kDa (Figura 5B, raias
397 7, 8 e 9). Provavelmente, a banda de 27 kDa representa a proteína parcialmente
398 glicosilada, enquanto que as bandas menores de 13 e 17 kDa, possivelmente,
399 correspondem à proteína parcialmente degradada e/ou não glicosilada.

400 Para avaliar em maior detalhe possíveis isoformas e produtos de degradação da
401 proteína, uma amostra do sobrenadante de cultura de células High-five infectadas com
402 baculovírus recombinante (*AcBacΔCC-GP64caIL-7*) com MOI 5 por 48 h e uma amostra
403 da mistura das frações cromatográficas livres de proteínas recombinantes, obtidas na
404 ausência de tunicamicina, foram examinadas por *Western blot*, usando-se anticorpo
405 monoclonal de camundongo anti-histidina, que é capaz de detectar a extremidade
406 carboxila da *rcaIL-7* (Figura 6). Na raia da membrana impregnada com proteínas do
407 sobrenadante contendo *rcaIL-7*, produzida na ausência de tunicamicina, foram
408 encontradas três bandas, com peso molecular de cerca de 25, 27 e 30 kDa. Curiosamente,
409 a banda de 27 kDa foi a mais intensa (Figura 6, raia 2). Na raia da membrana impregnada
410 com proteínas da amostra das frações cromatográficas, produzida na ausência de
411 tunicamicina, foram observadas duas bandas moderadamente largas com peso molecular
412 médio de 27 e 30 kDa (Figura 6, raias 3 e 4) e uma banda com tamanho médio de 25 kDa
413 (Figura 6, raia 3), correspondentes as bandas descritas previamente no ensaio de SDS-
414 PAGE. Esses dados sugerem que as três bandas representam isoformas da *rcaIL-7*.
415 Quando uma menor quantidade de proteína purificada foi usada no ensaio, foram
416 observadas apenas as bandas com 27 e 30 kDa (Figura 6, raia 4).

417 Depois da purificação da *rcaIL-7*, as frações cromatográficas livres de proteínas
418 contaminantes foram misturadas. A mistura foi submetida à troca de tampão para PBS
419 pelo método de diálise ou pelo uso de coluna cromatográfica de gel filtração e a
420 determinação proteica foi feita pelo método do ácido bicinonínico. Considerando, o
421 volume de sobrenadante de cada lote de purificação, o volume e a concentração proteína
422 das misturas de frações cromatográficas livres de proteínas recombinante, estimou-se um
423 rendimento de 5,6 mg (1º lote), 4,5 mg (2º lote) e 6,5 mg (3º lote) da *rcaIL-7* para cada

424 litro de cultura. A concentração de endotoxinas encontrada no 1º lote, o qual foi utilizado
425 para os ensaios *in vitro*, foi < 0,5 EU/mL, ou seja 0,002 EU/mg de rcaIL-7 purificada.

426 **Avaliação da atividade funcional de rcaIL-7 produzida em células High-five** 427 **infectadas com baculovírus recombinante**

428 Para avaliar a atividade biológica da citocina recombinante, CMNSP de oito cães
429 sadios marcadas com CFSE foram cultivadas presença de: a) meio RPMI completo
430 apenas (controle negativo), b) PHA a 6 µg/mL (controle positivo do ensaio) e c) rcaIL-7
431 a 40 ng/mL, por 5 ou 7 dias. Depois disso, a proliferação de linfócitos foi avaliada pela
432 redução de fluorescência correspondente ao CFSE por citometria de fluxo.

433 A figura 7 mostra os resultados de porcentagem de divisão dos linfócitos após 5 e
434 7 dias de cultivo com meio de cultura, rcaIL-7 a 40 ng/mL, PHA a 6 µg/mL. Após 5 dias
435 de cultivo, os valores encontrados de porcentagem de células divididas (%D), expressos
436 em média, foram de 2,85% (células cultivadas com meio de cultura), 7,42% (rcaIL-7) e
437 63,59% (PHA). Nessa avaliação, houve um aumento na porcentagem de divisão celular
438 dos linfócitos de 2,6 vezes quando essas células foram cultivadas na presença de rcaIL-7
439 em comparação às células cultivadas apenas com meio de cultura. Os resultados obtidos
440 com o uso dos mitógenos demonstraram que o ensaio foi realizado em condições
441 apropriadas para a avaliação de proliferação celular.

442 Já em relação ao 7º dia de cultivo, os valores encontrados de %D foram de 5,8 %
443 (células cultivadas com meio de cultura), 9,9 % (rcaIL-7) e 67,4 % (PHA). A porcentagem
444 de divisão celular dos linfócitos foi de 1,7 vezes quando essas células foram cultivadas
445 na presença de rcaIL-7 em comparação às células cultivadas apenas com meio de cultura.

446 A análise estatística dos dados de proliferação, realizada por ANOVA seguido de
447 pós-teste de Tukey, mostrou diferença significativa na proliferação de CMNSP cultivadas
448 na presença de rcaIL-7 em relação às células cultivadas apenas com meio de cultura, tanto
449 com 5 quanto 7 dias de cultivo ($p < 001$).

450 Tomando os dados em conjunto, rcaIL-7 (40 ng/mL) é capaz de promover a
451 proliferação de CMNSP de cães, acima da proliferação basal. Experimentos para
452 identificação de qual(is) subpopulação(ões) de linfócitos é (são) preferencialmente
453 expandida(s) (células T CD4 e/ou CD8, *naïve* e/ou células de memória) pela ação dessa
454 citocina estão em andamento.

455 **DISCUSSÃO**

456 Visando o futuro uso como agente imunomodulador em cães, no presente trabalho, a
457 sequência de DNA que codifica IL-7 canina (proteína madura) juntamente com a
458 sequência líder da GP64 do AcMNPV foi inserida no cromossoma artificial do
459 baculovírus, depois disso, foi obtido baculovírus recombinante. O baculovírus
460 recombinantes foi usado para produzir rcaIL-7 em células High-five com um rendimento
461 médio de 5,5 mg por litro de cultura. A rcaIL-7 produzida no sistema baculovírus células
462 de inseto mostrou-se capaz de promover a proliferação de linfócitos de sangue periférico
463 de cães.

464 Devido ao fato de ser uma glicoproteína das mais abundante no envelope viral, a
465 sequência líder de AcMNPV GP64 foi utilizada na construção o que facilita o processo
466 de produção da proteína recombinante (WHITFORD et al., 1989). Além disso, a
467 glicoproteína GP64 tem um papel importante no processo de penetração do vírus na célula
468 e promoção da fusão da membrana endossomal com o envelope viral (CHARLTON &
469 VOLKMAN, 1993; OOMENS; BLISSARD, 1999). A sequência líder encontra-se
470 presente na extremidade da subunidade ribossomal maior no processo de tradução para
471 síntese protéica e tem a capacidade de orientar o processo de produção para o retículo
472 endoplasmático, assegurando que a proteína não seja liberada no citosol (ALBERTS et
473 al., 2010 p.728).

474 Alguns estudos observaram que as construções de DNA com códons otimizados para
475 uma espécie quando comparadas com as construções com sequência selvagem de DNA,
476 tendem a gerar maior produção das proteínas codificadas em células homólogas
477 (GUSTAFSSON et al., 2004; GAO et al., 2013). Previamente em nosso laboratório,
478 construções de baculovírus recombinantes com inserto que codifica IL-12 e IL-2
479 contendo sequência líder para GP64 do AcMNPV, códons otimizados para *T. ni*. e cauda
480 de histidina foram usadas para infectar células High-five e o rendimento foi de pelo menos
481 5 mg da proteína recombinante correspondente por litro de cultura, rendimento similar ao
482 obtido para a proteína em estudo (rendimento médio de 5,5 mg/L).

483 Em geral, a cauda de histidina adicionada a proteínas recombinantes apresenta baixa
484 imunogenicidade e raramente interfere na estrutura ou função da proteína alvo (CHAGA,
485 HOPP, NELSON, 1999; GABERC-POREKAR; MENART, 2001). Em virtude disso e
486 com objetivo de facilitar o processo de purificação da proteína por cromatografia de
487 afinidade, a proteína rcaIL-7 foi produzida com uma cauda contendo 6 histidinas na
488 extremidade carboxila.

489 A transposição de insertos clonados no plasmídeo carreador *pFastbac1* para o
490 cromossoma artificial do baculovírus presente em *E. coli* da cepa DH10Bac Δ CC ocorre
491 devido a bactéria possuir um plasmídeo auxiliador que codifica uma enzima
492 (transposase). A transposase reconhece os sítios *Tn7L* e *Tn7R* do plasmídeo *pFastbac1* e
493 o sítio *attTn7* no cromossoma artificial do baculovírus e, a partir daí transfere o segmento
494 de DNA do plasmídeo para o bacmídeo (LUCKOW et al, 1993; MITRA et al., 2010).

495 Nesse trabalho, o plasmídeo carreador, contendo a construção de DNA que codifica
496 IL-7 canina (proteína madura), foi usado para transformar *E. coli* da cepa DH10Bac Δ CC
497 para a obtenção da transposição do segmento de DNA entre *Tn7L* e *Tn7R* do *pFastbac1*
498 para cromossoma artificial do baculovírus com sucesso. Essa conclusão baseou-se no fato
499 de que após a transformação foram observadas colônias brancas de *E. coli*. Além disso, a
500 análise do produto da PCR realizada com uma amostra de bacmídeo extraído de uma
501 colônia branca e oligonucleotídeos que flanqueiam os sítios *Tn7L* e *Tn7R* no cromossoma
502 artificial de baculovírus revelou uma banda de DNA com ~3000 pb, compatível com a
503 transposição.

504 O bacmídeo recombinante obtido foi utilizado para transfectar células de inseto para
505 produção de estoques de baculovírus. O procedimento para amplificação viral mostrou-se
506 bastante eficaz, uma vez que foi possível produzir, a partir de 2 mL de baculovírus
507 gerados após transfecção (P1), com título TCID₅₀ de $5,62 \times 10^7$ /mL, 100 mL de um
508 estoque viral amplificado (P2) com $3,99 \times 10^8$ /mL e a partir de 3 mL de P2 foi possível
509 produzir 100 mL de um estoque viral amplificado, denominado P3, com $6,9 \times 10^8$ /mL.

510 Ocasionalmente, proteínas recombinantes produzidas no sistema baculovírus-
511 células de inseto podem não ser secretadas eficientemente e/ou ser degradadas
512 parcialmente no interior de células. Alguns autores sugerem a baixa eficiência da secreção
513 ou degradação parcial de proteínas podem estar relacionadas a proteínas do vírus em
514 especial quitinase e catepsina e os produtos dos genes p26, p10 e p74 do vírus, que
515 competem pelos recursos celulares envolvidos na secreção proteica ou exibem atividade
516 proteolítica (HITCHMAN et al., 2009; HITCHMAN et al., 2010; KABA et al., 2004).

517 A linhagem de bactéria utilizada nesse trabalho (*E. coli* DH10Bac Δ CC, KABA et
518 al., 2004) possui cromossoma artificial do baculovírus desprovido dos genes da quitinase
519 (*chi*) e catepsina (*cath*). Dessa forma, o bacmídeo utilizado, em princípio, deveria
520 favorecer a secreção de proteínas em células de inseto e contribuir para a integridade da
521 proteína produzida. Apesar de não ter sido avaliada a produção de IL-7 dentro das células
522 infectadas, o rendimento da proteína secretada e purificada, (5,6 mg/L de cultura; 4,5 mg

523 /L e 6,48 mg/L para o 1º, 2º e 3º lotes, respectivamente) foi satisfatório para realização
524 de estudos *in vitro* e, futuramente, *in vivo* e, além disso, não foi observada degradação
525 protéica.

526 A análise das frações cromatográficas obtidas a partir de sobrenadante de células
527 High-five infectadas com o baculovírus recombinante *AcBacΔCC-GP64caIL-7*,
528 cultivadas na ausência de tunicamicina, realizada por SDS-PAGE e *Western blot*
529 revelaram três bandas de proteína com peso molecular maior que o peso predito para
530 *rcaIL-7* (18,7 kDa). Essas bandas de proteína, provavelmente, representam isoformas
531 glicosiladas da proteína recombinante (SMITH et al., 1983; STILLES et al., 1983;
532 SYDOW et al., 1996; SUN et al., 2002; KABA et al., 2004). Em ensaios realizados para
533 avaliar a presença de N-glicosilação na proteína recombinante, as células High-five foram
534 infectadas com o baculovírus recombinante *AcBacΔCC-GP64caIL-7* e cultivadas na
535 presença de tunicamicina. Nesses ensaios, o sobrenadante de cultura apresentou um
536 material precipitado após diálise contra PBS. Mesmo assim, as amostras das frações
537 cromatográficas obtidas foram analisadas por SDS-PAGE. Tais frações cromatográficas
538 mostraram três bandas de proteína de intensidade discreta com peso molecular de 13, 17
539 e 27 kDa. O encontro de material precipitado após a diálise e das bandas de proteína com
540 intensidade discreta sugerem que o tratamento com tunicamicina promoveu a produção
541 na forma denaturada e/ou resultou na redução da produção da proteína recombinante.
542 Além disso, o desaparecimento das bandas de proteína 25 e 30 kDa pelo tratamento com
543 tunicamicina, sugere que pelo menos essas bandas correspondem a formas N-
544 glicosiladas da *rcaIL-7*. A persistência da banda de proteína com 27 kDa indica que
545 tunicamicina usada a 5 µg/mL não foi suficiente para inibir completamente a N-
546 glicosilação. As bandas menores de 13 e 17 kDa, possivelmente, correspondem a proteína
547 parcialmente degradada e/ou não glicosilada. Um efeito indireto da tunicamicina em
548 componentes de maquinaria da célula envolvida na secreção poderia ser responsável pela
549 redução na produção da proteína (VERNET et al., 1990). Dados da literatura sugerem
550 que a glicosilação parece ter um importante papel na manutenção da estrutura,
551 enovelamento, estabilidade e transporte das proteínas para a secreção no meio de cultura
552 (KOBATA, 1992; WEERAPANA; IMPERIALI, 2006).

553 Treiber-held e colaboradores (1996) avaliaram a capacidade de IL-7 humana
554 (*rhuIL-7*) recombinante de estimular a proliferação de linfócitos a partir de CMNSP
555 homólogas. Nesses experimentos, os autores cultivaram CMNSP humanas por 1 a 19 dias
556 na presença de *rhuIL-7* a 100 ng/mL. Os autores observaram proliferação celular entre o

557 terceiro e o décimo nono dia de cultivo, sendo o pico de proliferação detectado no sétimo
558 e décimo dia. Curiosamente, esses autores também observaram proliferação celular de
559 baixa intensidade quando as CMNSP foram cultivadas com de meio de cultura, sem
560 estímulo adicional, entre os dias 7 e 11 do cultivo. A explicação para esse fato foi que ao
561 longo da cultura algumas células morreram, foram fagocitadas, e células fagocíticas
562 apresentaram antígenos a linfócitos sobreviventes. Previamente, em nosso laboratório,
563 Paiva (2011) avaliou a capacidade de rcaIL-7 produzida em *Escherichia coli* de induzir
564 proliferação celular quando incubada na concentração de 20 ng/mL por 4, 6, 8, 10, 12 e
565 14 dias com CMNSP de sete cães saudáveis. Nesse estudo, Paiva (2011) observou que
566 CMNSP tratadas com IL-7 revelou aumento na incorporação de timidina tritiada entre o
567 8º e 12º dia de cultivo, sendo que o pico de proliferação detectado no 8º dia, comparadas
568 com CMNSP cultivadas apenas com meio de cultura.

569 No presente trabalho, visando avaliar a atividade biológica, rcaIL-7 produzida no
570 sistema baculovírus-células de inseto, a proteína recombinante foi incubada a 40 ng/mL
571 com CMNSP de 8 cães saudáveis, por 5 e 7 dias. Antes do ensaio, as células foram marcadas
572 com CFSE e depois do ensaio, a fluorescência correspondente ao CFSE foi avaliada por
573 citometria de fluxo. A comparação entre as células submetidas a tratamentos diferentes
574 foi realizada pela determinação da porcentagem de divisão celular (%D). Após 5 dias de
575 cultivo a %D das CMNSP mantidas em meio com rcaIL-7 ou meio de cultura apenas foi
576 de 2,85 e 7,42, respectivamente, o que corresponde a um aumento de 2,6 vezes da %D
577 nas células tratadas com a proteína recombinante. A avaliação realizada no 7º dia de cultura
578 mostrou um aumento de 1,7 da %D das CMNSP incubadas com rcaIL-7.

579 Os resultados encontrados indicam que a proteína recombinante produzida no
580 sistema baculovírus células de inseto exibe atividade biológica. Além disso, com a
581 citocina rcaIL-7 produzida nesse trabalho, será possível realizar estudos de
582 imunomodulação e avaliação de estabelecimento de uma resposta de longa duração em
583 cães, os quais ainda não foram relatados na literatura. Reis e colaboradores (2005)
584 descreveram um método baseado em citometria de fluxo adequado para a determinação
585 de múltiplas subpopulações celulares em células de sangue periférico do cão, incluindo
586 células T CD4+ e T CD8+ *naïve* (CD45RA) e de memória (CD45RB). Em breve,
587 experimentos serão realizados com CMNSP de cães para determinação das
588 subpopulações linfocitárias que são estimuladas a proliferar pelo uso dessa citocina.

589 **REFERÊNCIAS**

590

591 ALBERT, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed,
592 2010. 728p.

593

594 BOYMAN, O. et al. Cytokines and T-cell homeostasis. **Curr. Opin. Immunol.** v. 19, n.
595 3, p. 320-326, 2007.

596

597 CHAGA, G.; HOPP, J.; NELSON, P. Immobilized metal ion affinity chromatography
598 on Co²⁺-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step
599 purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. **Biotechnol. Appl.**
600 **Biochem.** v.29, n. 1, p.19-24, 1999.

601

602 CHARLTON, C. A.; VOLKMAN, L. E. Penetration of *Autographa californica* nuclear
603 polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLBSF21 cells induces action cable
604 formation. **Virology**, v.197, p.245-254, 1993.

605

606 COLPITTS, S. L.; DALTON, N. M.; SCOTT, P. IL-7 receptor expression provides the
607 potential for long-term survival of both CD62L^{high} central memory T cells and Th1
608 effector cells during *Leishmania major* infection. **J. Immunol.** v. 182, n.9, p. 5702-
609 5711, 2009.

610

611 COOK, G. C. Leishmaniasis: some recent developments in chemotherapy. **J. Antimicrob.**
612 **Chemother.** v. 31, n.3, p. 327-330, 1993.

613

614 FERNANDES, A. P. et al. Protective immunity against challenge with *Leishmania*
615 (*Leishmania*) *chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine**,
616 v. 26, n. 46, p. 5888-5895, 2008.

617

618 GABERC-POREKAR, V.; MENART, V.. Perspectives of immobilized-metal affinity
619 chromatography. **J. Biochem. Bioph. Meth.** v. 49, n. 1, p. 335-360, 2001.

620

621 GAO, J. et al. Codon optimization of the rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV)
622 capsid gene leads to increased gene expression in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) cells.
623 **J. Vet. Sci.** v. 14, n. 4, p.441-7, 2013.

624

625 GRABSTEIN, K.H. et al. Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an
626 anti-interleukin 7 monoclonal antibody. **J. Exp. Med.** v. 178, n. 1, p. 257- 264, 1993.

627

628 GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and
629 heterologous protein expression. **Trends Immunol.** v. 22, n. 7, p. 346-53, 2004.

630

631 HENNEY, C.S. Interleukin 7: effects on early events in lymphopoiesis. **Immunol.**
632 **Today**, v. 10, n. 5, p. 170-173, 1989.

633

634 HITCHMAN, R. B.; POSSEE, R. D.; KING, L. A. Baculovirus expression systems for
635 recombinant protein production in insect cells. **Recent. Pat. Biotechnol.** v. 3, n. 1, p.
636 46-54, 2009.

637

- 638 HITCHMAN, R. B. et al. Improved expression of secreted and membrane-targeted
639 proteins in insect cells. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 56, n. 3, p. 85-93, 2010.
640
- 641 HOFMEISTER, R. et al. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action.
642 **Cytokine Growth Factor Ver.** v. 10, n. 1, p. 41-60, 1999.
643
- 644 JIANG, Q. et al. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. **Cytokine Growth Factor**
645 **Ver.** v. 16, n. 4, p. 513-533, 2005.
646
- 647 KABA, S. A. et al. Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for
648 improved integrity of secreted recombinant proteins. **J. Virol. Methods.** v. 122, n. 1, p.
649 113-118, 2004.
650
- 651 KOBATA, A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. **Eur. J.**
652 **Biochem.** v. 209, n. 2, p. 483–501, 1992
653
- 654 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
655 bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
656
- 657 LEE, S.K.; SURH, C.D. Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis.
658 **Immunol. Rev.** v. 208, n.1, p. 169- 180, 2005.
659
- 660 LUCKOW, V. A. et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by
661 site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome
662 propagated in *Escherichia coli*. **J. virol.** v. 67, n. 8, p. 4566-4579, 1993.
663
- 664 MA, A.; KOKA, R.; BURKETT, P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in
665 lymphoid homeostasis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 657-679, 2006.
666
- 667 MAEURER, M. J. et al. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of
668 *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect. Immun.** v. 68, n. 5, p. 2962-2970,
669 2000.
670
- 671 MAZZUCHELLI, R.; DURUM, S. K. Interleukin-7 receptor expression: intelligent
672 design. **Nat. Rev. Immunol.** v. 7, n. 2, p. 144-154, 2007.
673
- 674 MITRA, R. et al. Characterization of the TnsD-attTn7 complex that promotes site-
675 specific insertion of Tn7. **Mob. DNA**, v. 1, n. 1, p. 1, 2010.
676
- 677 NAMEN, A. E. et al. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and
678 characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. **J. Exp. Med.** v.
679 167, n. 3, p. 988-1002, 1988.
680
- 681 NANJAPPA, S. G. et al. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are
682 influenced by the timing of therapy in mice. **J. Clin. Invest.** v. 118, n. 3, p. 1027-1039,
683 2008.
684
- 685 OOMENS, A.G.P.; BLISSARD, G.W. Requirement for GP64 to drive efficient budding
686 of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. **Virol.** v. 254, n. 2, p. 297-
687 314, 1999.

- 688
689 O'REILLY, D. R., MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression**
690 **vectors: a laboratory manual**. 4 ed., USA: Oxford University Press. 347p. ISBN
691 10: 0195091310 / ISBN 13: 978-01-950-9131-1, 1994.
- 692
693 PAIVA, B. P. **Produção e avaliação dos efeitos biológicos de IL-7 e IL-15 caninas**
694 **recombinante**. 2011. 83f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia em
695 Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2011.
- 696
697 PELLEGRINI, M.; MAK T. W. Tumor immune therapy: lessons from infection and
698 implications for cancer - can IL-7 help overcome immune inhibitory networks? **Eur. J.**
699 **Immunol.** v. 40, n.7, p. 1852-1861, 2010.
- 700
701 RATHMELL, J. C. et al. IL-7 enhances the survival and maintains the size of *naïve* T
702 cells. **The J. Immunol.** v. 167, n. 12, p. 6869-6876, 2001.
- 703
704 REIS, A. B. et al. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment
705 and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood
706 leukocytes. **Vet. Immunol. Immunop.** v. 103, n. 3, p. 173-185, 2005.
- 707
708 SAKATA, T. et al. Constitutive expression of interleukin-7 mRNA and production of
709 IL-7 by a cloned murine thymic stromal cell line. **J. Leukoc. Biol.** v. 48, n. 3, p. 205-
710 212, 1990.
- 711
712 SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - a Laboratory Manual**. 3 ed.
713 New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 714
715 SCHLUNS, K. S.; LEFRANÇOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development
716 and survival. **Nat. Rev. Immunol.** v. 3, n. 4, p. 269-279, 2003.
- 717
718 SERETI, I. et al. IL-7 administration drives T cell–cycle entry and expansion in HIV-1
719 infection. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6304-6314, 2009.
- 720
721 SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta
722 interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Mol. Cell. Biol.**
723 v. 3, n. 12, p. 2156-2165, 1983.
- 724
725 SUDO, T. et al. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine
726 lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 90, n. 19, p. 9125-9129, 1993.
- 727
728 SUN, S. et al. Expression, purification, and kinetic characterization of full-length
729 human fibroblast activation protein. **Protein. Expr. Purif.** v. 24, n. 2, p. 274-281, 2002.
- 730
731 SYDOW, S. et al. Overexpression of a functional NMDA receptor subunit (NMDAR1)
732 in baculovirus-infected *Trichoplusia ni* insect cells. **Mol. Brain Res.** v. 41, n. 1, p. 228-
733 240, 1996.
- 734
735 TREIBER-HELD, S. et al. Release of sIL-2R α from and activation of native human
736 peripheral blood mononuclear cells by recombinant IL-15. **Clin. Immunol.**
737 **Immunopathol.** v. 80, n. 1, p. 67-75, 1996.

- 738
739 VERNET, T. et al. Secretion of functional papain precursor from insect cells.
740 Requirement for N-glycosylation of the pro-region. **J. Biol. Chem.** v. 265, n. 27, p.
741 16661-16666, 1990.
- 742
743 VIVIEN, L.; BENOIST, C.; MATHIS, D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6
744 to survive in vivo. **Int. Immunol.** v. 13, n. 6, p. 763–768, 2001.
- 745
746 VON FREEDEN-JEFFRY, U. et al. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted
747 mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. **J. Exp. Med.** v. 181, n. 4, p. 1519-
748 1526, 1995.
- 749
750 WEERAPANA, E.; IMPERIALI, B. Asparagine-linked protein glycosylation: from
751 eukaryotic to prokaryotic systems. **Glycobiology**, v. 16, n. 6, p. 91R-101R, 2006.
- 752
753 WEI, C.; ZEFF, R.; GOLDSCHNEIDER, I. Murine pro-B cells require IL-7 and its
754 receptor complex to up-regulate IL-7R alpha, terminal deoxynucleotidyltransferase, and
755 c mu expression. **J. Immunol.** v. 164, n. 4, p. 1961-1970, 2000.
- 756
757 WILLIAMS, K. M.; HAKIM, F. T.; GRESS, R. E. T cell immune reconstitution
758 following lymphodepletion. **Semin. Immunol.** v. 19, n. 5, p. 318-330, 2007.
- 759
760 WHITFORD, M. A. R. C. et al. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67,
761 an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear
762 polyhedrosis virus. **J. Virol.** v. 63, n. 3, p. 1393-1399, 1989.
- 763
764 WHO. Technical Report Series. Control of Leishmaniasis. **World Health Organization**,
765 Geneva, Switzerland, 2010.

766 **Legendas:**

767 **Figura 1. Desenho esquemático da construção de DNA usada para a produção de IL-7 canina no**
 768 **sistema baculovírus células de inseto.** A construção de DNA foi concebida com os seguintes elementos
 769 na orientação 5'-3': um sítio de restrição para endonuclease *SaII* e uma série de nucleotídeos que
 770 codificam a sequência líder da proteína GP64 do AcMNPV, a IL-7 canina (proteína madura), um
 771 espaçador com 23 aminoácidos, uma cauda de seis histidinas, um sítio de restrição para endonuclease
 772 *NotI*, e dois códons de parada.

773 **Figura 2: Avaliação por eletroforere em gel de agarose de plasmídeo purificado de *E. coli***
 774 **transformada com o produto de ligação entre *GP64caIL-7* e *pFastBac1*.** Exemplo representativo de
 775 amostras de plasmídeo purificado de *E. coli* transformada com o produto de ligação entre *GP64caIL-7* e
 776 *pFastBac1* contendo inserto. Uma amostra de 4 µl de mini-preparação de plasmídeo foi digerida com as
 777 endonucleases de restrição *Sal I* e *Not I* em analisadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de
 778 etídio por eletroforese. Raia 1: marcadores de pares de bases (pb) e amostra de plasmídeo digerido. Setas
 779 indicam bandas com 4755 pb e 622 pb, correspondentes ao plasmídeo *pFastBac1* digerido e ao inserto
 780 *GP64caIL-7*.

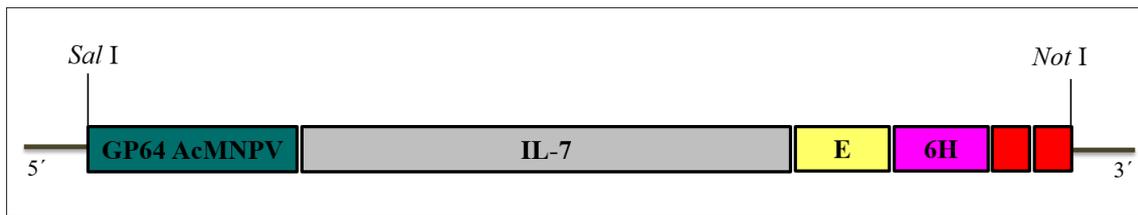
781 **Figura 3: Avaliação do produto de PCR de bacmídeo por eletroforese em gel de agarose.** Produto de
 782 PCR realizada com oligonucleotídeos iniciadores que flaqueiam os sítios Tn7R e Tn7R e bacmídeo extraído
 783 de uma colônia branca de *E. coli* DH10BACΔCC com fenótipo confirmado transformada com *pFastBac1*-
 784 *GP64caIL-7* foi avaliado em um gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio por eletroforese. Raias:
 785 1) marcador de pares de bases (pb), 2) produto de PCR em reação com água ao invés de DNA e 3) produto
 786 de PCR em reação com DNA de bacmídeo. Seta indica banda de DNA com cerca de 3000 pb, correspondente
 787 a segmento de DNA transferido do *pFastBac1* (2300 pb) contendo o inserto *GP64caIL-7* (635 pb).

788 **Figura 4: Ensaio para a otimização da produção de IL-7 canina em células High-five infectadas com**
 789 **baculovírus recombinante *AcBacΔCC-GP64caIL-7*.** Os sobrenadantes de cultura de células High-five
 790 infectadas com baculovírus *AcBacΔCC-pFastBac1* (controle negativo) com MOI 10 (multiplicidade de
 791 infecção) ou *AcBacΔCC-GP64caIL-7* com MOI 2, 5 ou 10 pelo tempo de 24, 48 ou 72 h (TOI, tempo de
 792 infecção) foram avaliados por *dot blot*. O *dot blot* foi realizado usando-se anticorpo anti-histidina região c-
 793 terminal, conjugado a fosfatase alcalina.

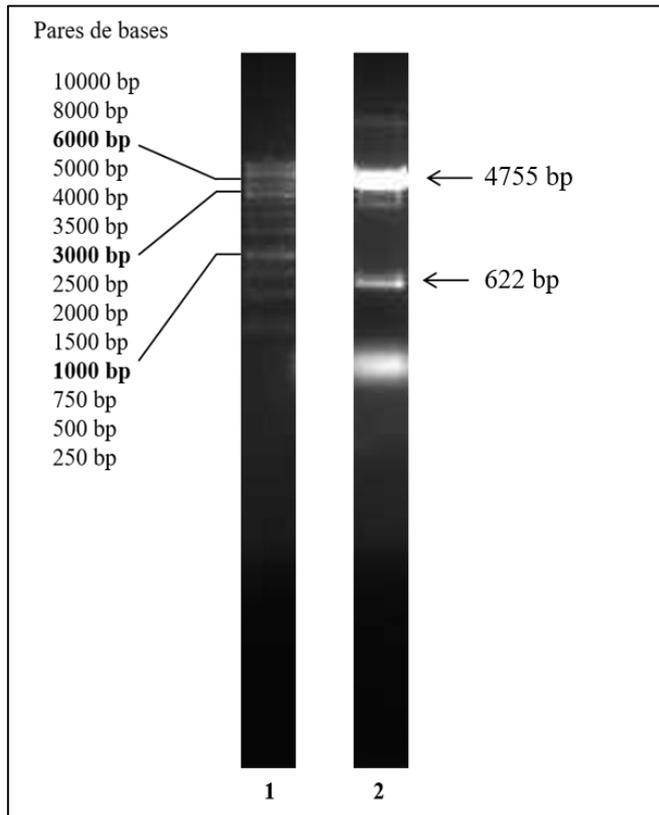
794 **Figura 5: Avaliação da purificação da rcaIL-7 canina por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-**
 795 **PAGE 15%).** Interleucina 7 recombinante canina (IL-7rca) purificada na ausência de tunicamicina (A),
 796 representando os 3 lotes produzidos, e na presença de Tunicamicina (B), lote único. Raia 1: marcador de
 797 peso molecular; raia 2: amostra aplicada na coluna (afluente); raia 3: material que não se prendeu à coluna
 798 (efluente); raias 4, 5, 6, 7, 8 e 9: frações de eluição. Considerando as raias 7, 8 e 9, as setas indicam em:
 799 (A) três bandas correspondentes a rcaIL-7 purificada (25, 27 e 30 kDa) com diferentes padrões de
 800 glicosilação e, em (B) três bandas correspondentes, possivelmente, a proteína (rcaIL-7) parcialmente
 801 degradada e/ou não glicosilada (13, 17 kDa) e a forma parcialmente glicosilada da rcaIL-7 (27 kDa),
 802 respectivamente.

803 **Figura 6. Detecção por Western blot da proteína recombinante purificada por cromatografia de**
804 **afinidade.** Raia 1: marcador de peso molecular; raia 2: sobrenadante de células High-Five infectadas com
805 baculovírus recombinante *AcBac Δ CC-GP64caIL-7*; raias 3 e 4: proteína purificada na ausência de
806 tunicamicina, rcaIL-7 (2 μ g) e rcaIL-7 (1 μ g), respectivamente. As raias foram incubadas com anticorpo
807 anti-histidina c-terminal na diluição de 1:1000 e com anticorpos anti-imunoglobulina de camundongo
808 conjugado a fosfatase alcalina na diluição de 1:500. A revelação foi feita pela adição do substrato contendo
809 BCIP e NBT, conforme descrito em material e métodos. As setas indicam bandas da proteína recombinante
810 (30, 27, 25 kDa).

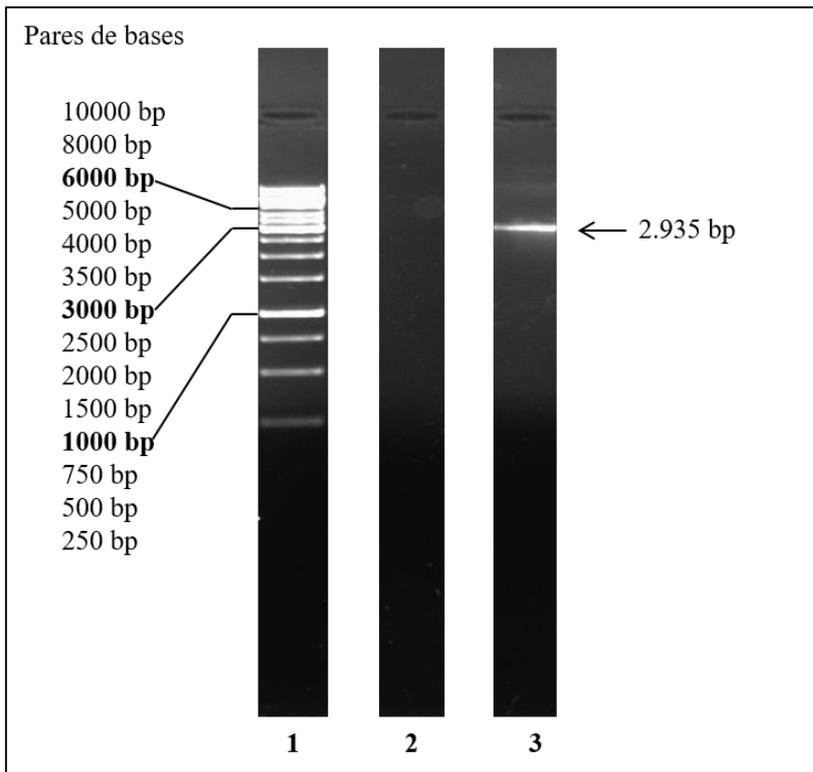
811 **Figura 7. Proliferação de linfócitos de cão após estimulação com rcaIL-7.** CMNSP de cada um dos 8
812 cães foram coradas com CFSE e cultivadas apenas com meio de cultura RPMI completo ou RPMI completo
813 com rcaIL-7 a 40 ng/mL (A e B) e fitohemaglutinina (PHA) a 6 μ g/mL (C e D), por 5 e 7 dias. A avaliação
814 da proliferação celular foi feita por citometria de fluxo e os resultados foram representados como
815 porcentagem de células divididas (%D).

816 **Figura 1:**

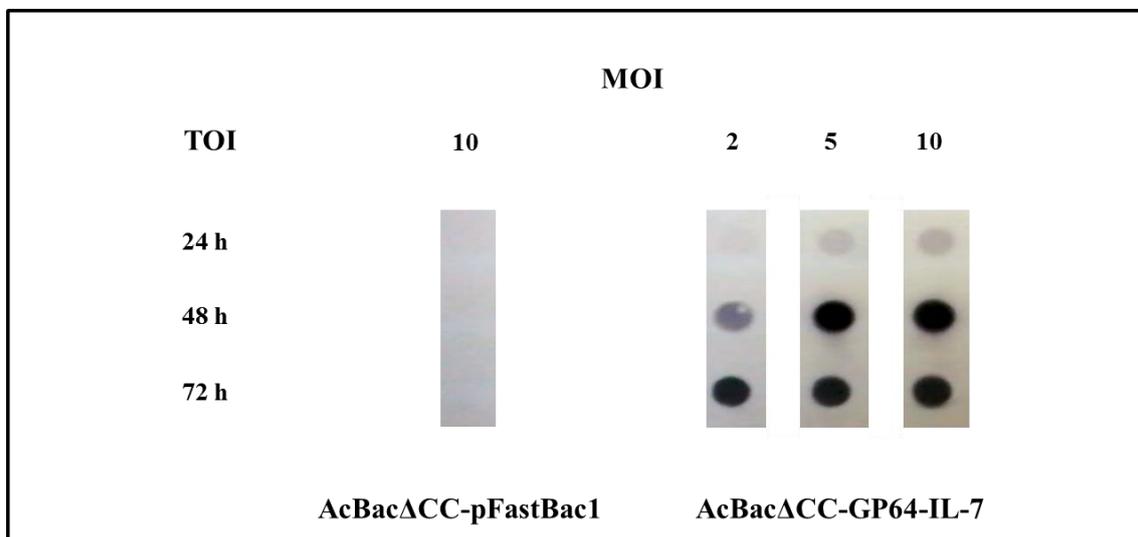
817

818 **Figura 2:**

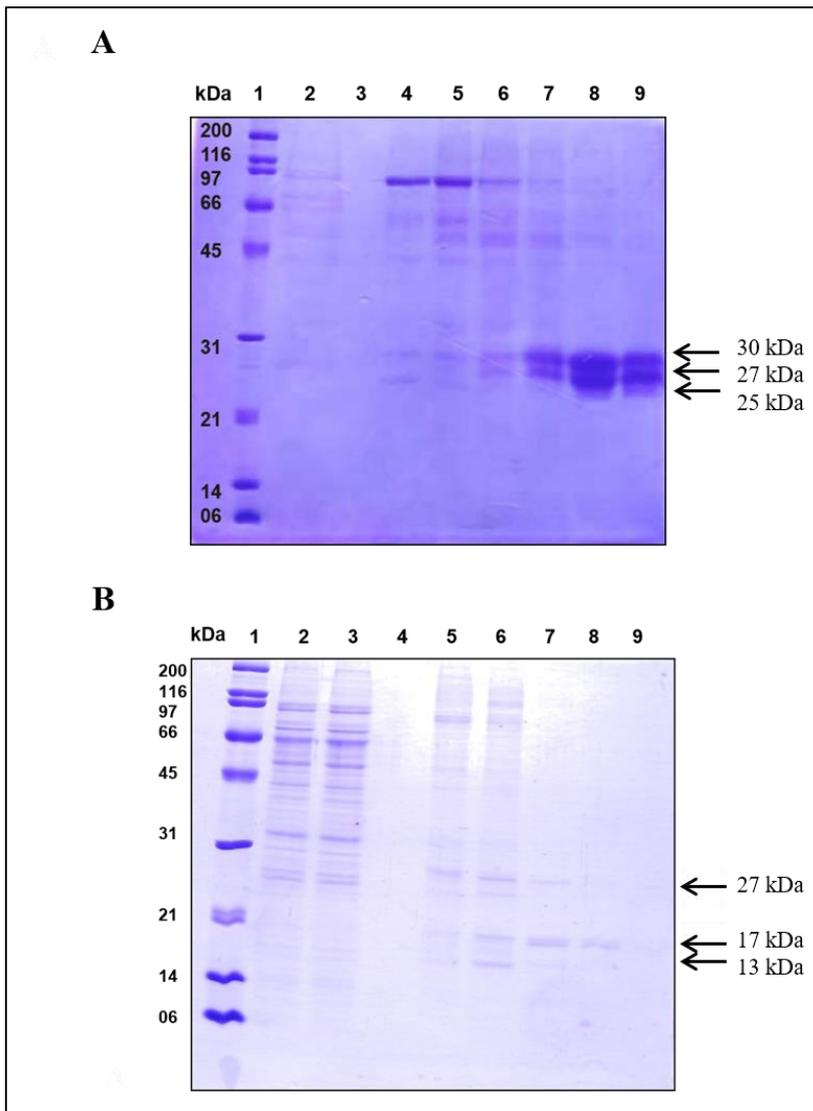
819

820 **Figura 3:**

821

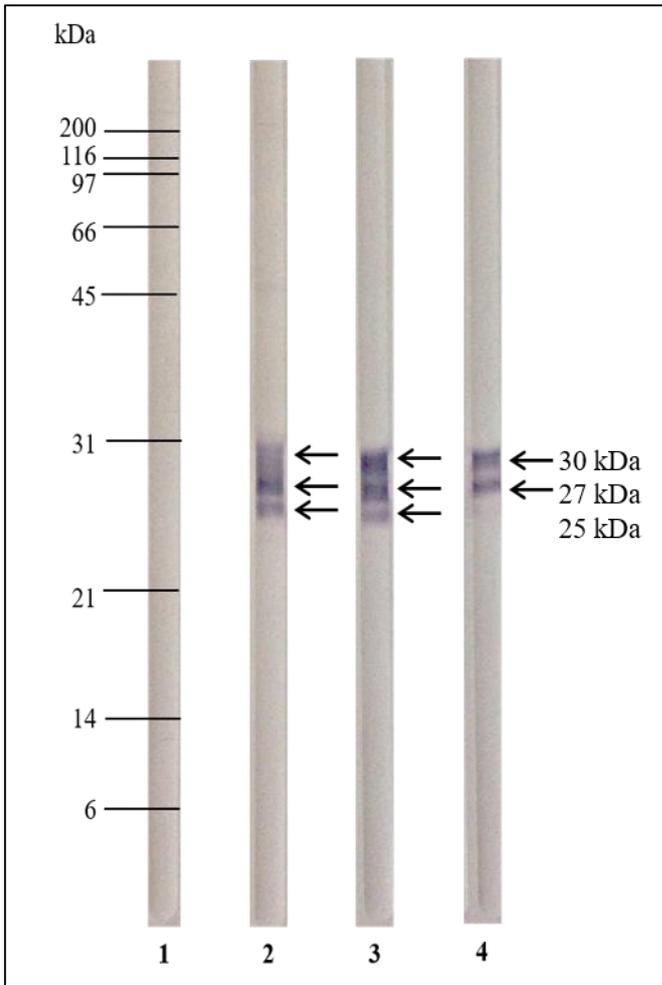
822 **Figura 4:**

823

824 **Figura 5:**

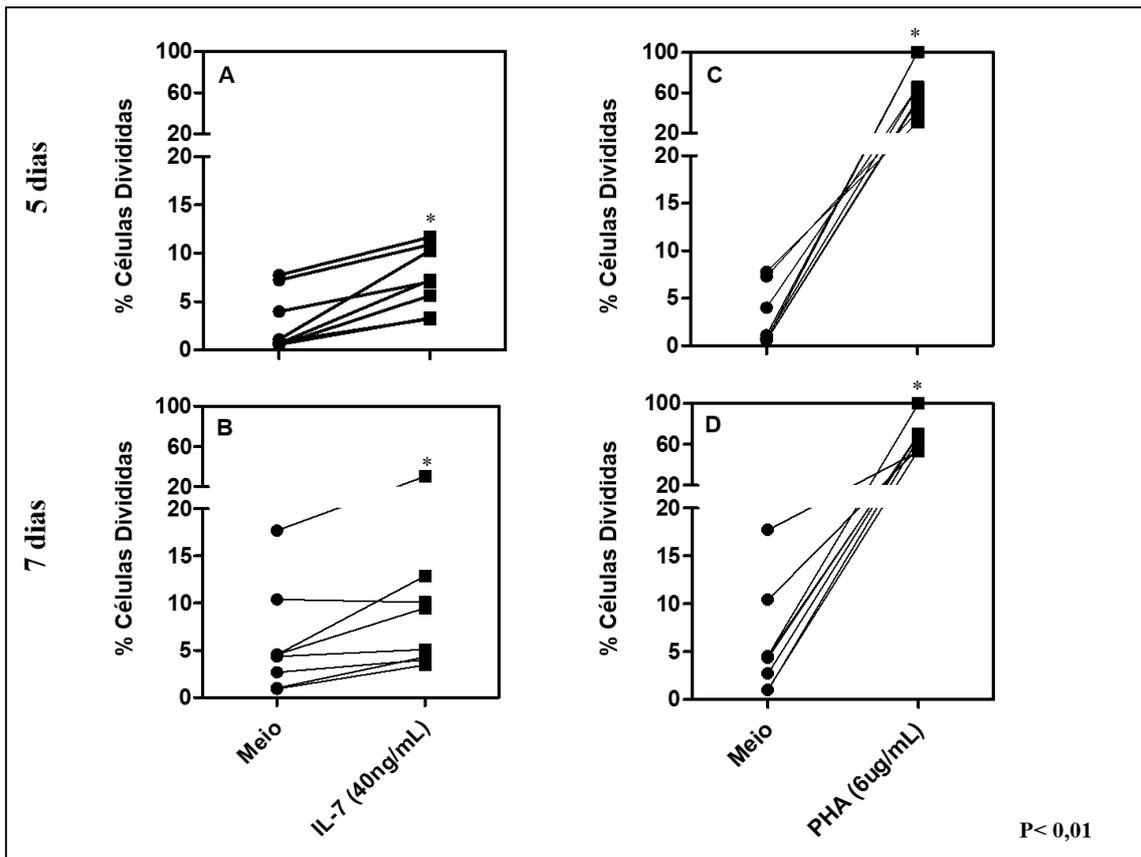
825

826 **Figura 6:**



827

828 **Figura 7:**



829