



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE IL-7 E IL-15 CANI-
NAS RECOMBINANTES**

BIANCA PETITINGA DE PAIVA

Salvador – Brasil

2011

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa
PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE IL-7 E IL-15
CANINAS RECOMBINANTES
BIANCA PETITINGA DE PAIVA

ORIENTADOR: DR. GERALDO GILENO DE SÁ OLIVEIRA

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

Salvador – Brasil

2011

Dedico este trabalho a melhor parte da minha vida:

*Raquel & Oswaldo,
Fabienne, Pedro & Thomaz,
Vitor & Mia*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Geraldo Gileno, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, pelas discussões e sugestões.

Ao Dr. Gustavo Saldaña, pela ajuda fundamental com as proteínas.

À Dra. Fabienne Paiva, pelas sugestões, críticas e imensa ajuda no trabalho.

Aos funcionários Elivani Sacramento e Sérgio Vasconcelos, pela realização de procedimentos que facilitam nosso trabalho e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Flávia Paixão, nossa administradora, que sempre nos ajudou, com sorrisos e bom humor, a resolver problemas burocráticos.

A todos os colegas do LPBI, em especial, Cris, Naiara e Landim, pela convivência e pela amizade.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, em particular, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pela oportunidade de realizar o curso.

Aos meus queridos amigos cariocas que sempre torcem por mim e me fazem sentir uma imensa saudade do lugar que eu considero o melhor do mundo

Ao meu cunhado, Mark Andrew, por me acolher em SSA com tanto carinho e por me socorrer com o inglês.

Agradeço por último, porque sempre deixo o melhor para o final, as pessoas mais importantes da minha vida:

Obrigada mãe, pelo seu apoio, pelo amor incondicional e por tudo que você me ensinou.

Obrigada pai, por todo o incentivo ao longo da vida e, principalmente, por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava.

Obrigada irmã, por ter abraçado esse trabalho, pela amizade e pela deliciosa convivência no laboratório, por apresentar o amor da minha vida e por ser meu grande exemplo.

Obrigada Vitor, príncipe dos meus sonhos, por todas as sugestões e ajuda ao longo desse trabalho, por não me deixar desistir e por trazer leveza e alegria à minha vida.

A todos aqueles que, embora não nomeados, também fizeram parte desse trabalho.

PAIVA, Bianca Petitinga. PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DE IL-7 E IL-15 CANINAS RECOMBINANTES. Dissertação – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

RESUMO

A maioria dos cães com leishmaniose visceral submetida à quimioterapia convencional apresenta recaída após a interrupção do tratamento, talvez, pelo fato desses animais desenvolverem resposta imune celular específica apenas transitoriamente. Uma vez que as citocinas IL-7 e IL-15 são descritas na literatura como sendo capazes de promover resposta imune celular de longa duração (memória), o presente trabalho teve como objetivo a clonagem, a expressão e a avaliação da atividade biológica de IL7 e IL-15 recombinantes caninas (rca-IL-7 e rcaIL-15). Diversos estudos têm demonstrado o papel essencial da IL-7 e IL-15 na homeostase de células-T. A Interleucina-7 é um fator de crescimento e anti-apoptótico de linfócitos T, sendo essencial para a sobrevivência de células T maduras, *naïve* e células de memória, especialmente CD4⁺. IL-15 apresenta um amplo espectro de atividades biológicas. É crucial para o desenvolvimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação de múltiplas células tanto da imunidade inata, quanto da imunidade adaptativa, e apresenta papel essencial na manutenção de células T CD8⁺ de memória. Nesse trabalho descreveu-se a clonagem do DNA complementar (cDNA) e a expressão de IL-7 e IL-15 recombinantes caninas biologicamente ativas em *Escherichia coli*. Para expressão em *E. coli* foram realizadas as clonagens do cDNA de IL-7 e de IL-15 no vetor pRSET, gerando as construções pRSET-calL-7 e pRSET-calL-15. O sucesso da clonagem em ambos os vetores de expressão foi confirmado a partir do sequenciamento. As proteínas foram expressas como proteína de fusão com seis moléculas de histidina na extremidade amina da cadeia polipeptídica e após serem solubilizadas com uréia, as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade e renaturadas por diálise. A avaliação da atividade biológica de IL-15 canina purificada foi realizada em células CTLL-2 e foi demonstrada uma relação dose dependente na faixa de concentração proteica de 0,9 ng/mL até 1 µg/mL. O mesmo efeito foi demonstrado quando essas células foram cultivadas na presença de diferentes diluições de T-STIM (controle positivo do ensaio). Visando determinar as condições em que rca-IL-7 e rca-IL-15 são capazes de induzir efeitos biológicos *in vitro*, foram realizados experimentos com diferentes doses de ambas as citocinas e demonstrado pela primeira vez que tanto IL-7 quanto IL-15 são capazes de induzir a proliferação de CMNSP de cães pré-ativadas com PHA. Adicionalmente, as citocinas foram avaliadas quanto à capacidade de estimulação da proliferação de CMNSP de cães sem estímulo prévio ou concomitante e foi possível observar que rca-IL-7 foi capaz de manter a proliferação dessas células por até 12 dias de cultivo, enquanto rca-IL-15 foi capaz de fazê-lo por até 14 dias. Diante dos resultados obtidos a rca-IL-7 e rca-IL-15 poderão ser utilizadas no futuro em estudos que visam o estabelecimento de uma resposta de longa duração em cães com LVC submetidos à quimioterapia convencional.

Palavras-chave: Interleucina-7, Interleucina 15, CMNSP, Cão.

PAIVA, Bianca Petitinga. PRODUCTION AND EVALUATION OF BIOACTIVITY.OF RECOMBINANT CANINE IL-7 AND IL-15. - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

ABSTRACT

Most dogs with LV subjected to conventional chemotherapy has relapsed after discontinuation of treatment, possibly due these animals develop specific cellular immune response transiently. Since IL-7 and IL-15 are described in the literature as being capable of promoting cellular immune response of long-term (memory), this study aimed at cloning, expression and biological activity evaluation of rca-IL7 and rca IL-15. Many studies have demonstrated the essential role of IL-7 and IL- 15 in the homeostasis of T-cells. The Interleukin-7 is a growth and anti-apoptotic factor of T lymphocytes, essential for the occurrence of mature, naïve, and memory T cells, especially CD4+. IL-15 presents a wide spectrum of biological activities. It is crucial for the development, proliferation, survival, and differentiation of multiple cells of innate immunity as well as of adaptive immunity, and presents an essential role in the maintenance of CD8+ memory T cells. This work describes the cloning of complementary DNA (cDNA) and the expression of IL-7 and IL-15 canine recombinants biologically active in *Escherichia coli*. For expression in *E. coli*, we cloned cDNA of IL-7 and IL- 15 in the vector pRSET, generating the constructions pRSET-call7 and pRSET-call-15. The success of the cloning in both the expression vectors was confirmed from the sequencing. The proteins were expressed as fusion protein with six molecules of histidine in the amine extremity of the polypeptide chain and afterwards were solubilized with urea, the proteins were purified by affinity chromatography and renatured by dialysis. The evaluation of the biological activity of purified canine IL-15 was achieved in CTLL-2 cells and a dose-dependent relation in the range of protein concentration of 0.9 ng/mL to 1 µg/mL was demonstrated. The same effect was demonstrated when these cells were cultivated in the presence of different dilutions of T-STIM (positive control of the test). With the goal of determining the conditions in which rca-IL-7 and rca-IL-15 are capable of inducing biological effects *in vitro*, we carried out experiments with different doses with both the cytokines and demonstrated for the first time that IL-7 as well as IL-15 are capable of inducing proliferation of PBMC of dogs pre-activated with PHA. Also, the cytokines were evaluated as to the capacity of stimulation of the proliferation of PBMC of dogs without previous or concomitant stimulation and it was possible to observe that rca-IL-7 was capable of maintaining the proliferation of these cells for up to 12 days of cultivation, while rca-IL-15 was capable of doing it for 14 days. Considering the results obtained rca-rca-7 and IL-IL-15 may be used in future studies that aim to establish a long-term response in dogs with CVL undergoing conventional chemotherapy

Keywords: Interleukin-7, Interleukin-15, PBMC, dogs

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura		Página
1	Eletoforese em gel de poliacrilamida da expressão e avaliação de rca-IL-7 e rca-IL-15 purificadas e renaturadas.....	39
2	Avaliação da atividade biológica de rca-IL-15 em células CTLL-2.....	41
3	Avaliação da atividade proliferativa de rca-IL-7 e rca-IL-15 sobre CMNSP, pré-ativadas com PHA e IL-2, de cães.....	43
4	Avaliação da atividade proliferativa de rca-IL-7 e rca-IL-15 sobre CMNSP de cães sem estimulação prévia ou concomitante.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	menor
=	igual
μCi	micro Curie
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
ATP	adenosina trifosfato
Bcl-2	<i>B cell leukemia</i>
Bcl-xL	<i>B cell leukemia/lymphoma -xL</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cm ²	centímetro quadrado
CMNSP	células mononucleares de sangue periférico
Con A	concanavalina A
cpm	contagem de partículas betas por minuto
D.O.	densidade óptica
DC	célula dendrítica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	dithiotreitol
g	gravidade
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
h	hora
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etano- sulfônico
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HTLV-1	vírus T-linfotrópico humano tipo 1
IFN-γ	interferon gama
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IL-15R	receptor para interleucina-15
IL-15Rα	cadeia alfa do receptor de interleucina-15
IL-2 ^{-/-}	animal deficiente em IL-2
IL-2Rα	cadeia alfa do receptor de interleucina-2
IL-2Rα ^{-/-}	animal deficiente em cadeia alfa do receptor de interleucina-2
IL-7R	receptor para interleucina-7
IL-7Rα	cadeia alfa do receptor de interleucina-7
IP	índice de proliferação
IPTG	isopropil-beta-D-thiogalactosídeo
kDa	Kilodáton
LB	Luria Bertani
LPS	lipopolissacarídeo
mAb	Anticorpo monoclonal
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
mg	miligrama

min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
NK	<i>natural killer</i>
NKT	células T <i>natural killer</i>
nm	nanômetro
pb	pares de base
PBS	tampão fosfato salina (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	reação em cadeia de polimerase
PHA	fitohemaglutinina (<i>Phytohemagglutinin</i>)
rca	recombinante canina
rh	recombinante humana
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
rov	recombinante ovino
rpm	rotação por minuto
RPMI 1640	meio 1640 do Instituto <i>Roswell Park Memorial</i>
RT	transcrição reversa
SBF	soro bovino fetal
SCID	imunodeficiência combinada severa
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
TCR	receptor de células T
Th	células T <i>helper</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
UI	unidades internacionais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Interleucina-7.....	16
2.2. Interleucina 15.....	19
2.3. A Leishmaniose Visceral.....	23
3. OBJETIVOS	26
3.1. Geral.....	26
3.2. Específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1.3. Seleção de clones de Escherichia coli contendo as construções pRSET-ca-IL-7 e pRSET-ca-IL-15.....	29
4.1.4. Sequenciamento dos insertos codificantes de ca-IL-7 e ca-IL-15 em pRSET.....	30
4.1.5. Produção de ca-IL-7 e ca-IL-15 recombinante em Escherichia coli.....	30
4.3. Animais.....	34
4.4.1. Obtenção de CMNSP.....	35
4.4.3. Avaliação da capacidade de rca-IL7 e rca-IL-15 de induzir proliferação de CMNSP de cães sem estímulo prévio ou concomitante.....	36
Volumes 100 µL de suspensão de CMNSP, a 2 x 10 ⁶ células/mL, de cada um dos sete cães foram colocados em poços de placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Corning). Em cada triplicata de poços, foi acrescentado um volume de 100 µL/poço de meio RMPI 1640 suplementado ou RMPI 1640 suplementado contendo rca-IL-7 a 20 ou 40 ng/mL ou contendo rca-IL-15 a 31,2, 125 ou 500 ng/mL. As placas de microtitulação foram incubadas por 4, 6, 8, 10, 12 ou 14 dias a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO ₂ . Dezoito horas antes do termino do cultivo, 30 µL de meio RMPI suplementado contendo 1 µCi de timidina[³ H] foram acrescentados a cada poço. As placas foram mantidas a -20° C até a coleta de células e contagem das partículas beta, conforme descrição acima.....	36
4.5. Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1. Produção de rca-IL-7 e rca-IL-15.....	38
5.1.1. Clonagem de rca-IL-7 e rca-IL-15.....	38
5.1.2. Purificação de rca-IL-7 e rca-IL-15.....	39
5.2. Avaliação da atividade biológica de rca-IL-15 em células CTLL-2.....	40

5.3. Avaliação da capacidade de rca-IL-7 e rca-IL-15 de induzir proliferação de CMNSP pré-ativadas pelo tratamento com PHA E IL-2.....	44
5.4. Avaliação da capacidade de rca-IL-7 ou rca-IL-15 de induzir proliferação de CMNSP sem estimulação adicional prévia ou concomitante.....	47
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÕES.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

O sistema imunológico pode ser dividido em dois subsistemas principais, um sistema capaz de realizar respostas imunes inatas e outro capaz de realizar respostas imunes adaptativas. Elementos desses dois subsistemas interagem entre si para gerar respostas imunes eficazes. (CLEM, 2011; ABBAS *et al.*, 2008).

A resposta imune inata é exercida por um conjunto de elementos, incluindo barreiras físicas (ex: pele e mucosas), químicas (ex: secreção gástrica), moléculas (ex: fatores do complemento, defensinas e catelicidinas) e células (ex: células “natural killer”, neutrófilos e histiócitos). Esses elementos proporcionam a primeira linha de defesa contra microrganismos e estão presentes em mamíferos antes mesmo do estabelecimento de infecções. Os elementos celulares e moleculares da imunidade inata estão programados para responder rapidamente a infecções (ABBAS *et al.*, 2008; AKIRA, 2011). A resposta imune inata que ocorre após o reconhecimento de padrões moleculares conservados em grupos de microrganismos, não é específica para cada patógeno e não resulta no desenvolvimento de memória imunológica. Como certos padrões moleculares de patógenos encontram-se ausentes em mamíferos, os elementos responsáveis pela resposta imune inata tendem a não reconhecer e atacar células do próprio organismo (CLEM, 2011).

Em contraste com o sistema imune inato, o sistema imune adaptativo reconhece moléculas ou partes de moléculas (epitopos) de cada agente patogênico com extraordinária especificidade. A resposta imune adquirida tende a ser duradoura e a ocorrer com maior intensidade a exposições subsequentes ao mesmo microrganismo, indicando a existência de uma memória imunológica (DUTTON *et al.*, 1998; CLEM, 2011).

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

Várias interleucinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21) compartilham uma mesma cadeia de receptor, denominada cadeia gama comum (γc), e por isso são agrupadas em uma família de citocinas referida como família γc . Essas citocinas desempenham papéis importantes em vários processos imunológicos, incluindo a regulação tanto da resposta imune inata, quanto na resposta imune adaptativa (ROCHMAN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010).

IL-7 e IL-15 possuem papéis importantes no desenvolvimento da homeostase de células linfóides, além de propriedades imunoestimuladoras. Por exemplo, diversos estudos sugerem que IL-7 e IL-15 podem ser usadas no processo de recuperação do sistema imunológico e/ou a otimização de terapias imunológicas, uma vez que essas citocinas agem como fatores de crescimento de células T, além de serem importantes na manutenção de células de memória (ALPDOGAN & VAN DEN BRINK, 2005).

O cão é considerado o principal reservatório da leishmaniose visceral (LV) zoonótica (DEANE & DEANE, 1955; VEXENAT *et al.*, 1994; SOLANO-GALLEGO *et al.*; 2001; COURTENAY *et al.*, 2002). Apenas uma parte dos cães que adquire naturalmente a infecção por uma das espécies de *Leishmania* (*L. infantum* e *L. chagasi*) causadoras da LV zoonótica irão desenvolver a doença. Esses animais quando são tratados com drogas usadas convencionalmente no tratamento de LV (ex: glucantime, anfotericina B e pentamidina) tendem a apresentar cura clínica e resposta imune celular específica (SLAPPENDEL & TESKE, 1997; MORENO *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999). No entanto, mesmo na ausência de re-infecção, alguns meses após a interrupção do tratamento, a maioria dos cães apresenta recaída e simultaneamente perda da resposta imune celular específica (MORENO *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999). A(s) razão(ões) pela qual(is) tais animais exibem recaída não é (são) conhecida(s). Uma possibilidade seria que, após o tratamento quimioterápico, não ocorra o estabelecimento resposta imune celular específica suficientemente polarizada para Th1 ou reposta imune de memória duradoura.

Como IL-7 e IL-15 são citocinas que em alguns modelos experimentais favorecem o estabelecimento de resposta imune de memória, seja dependente de célula T CD4 e/ou T CD8, seria interessante avaliar se cães curados clinicamente da LV

pelo uso de quimioterápicos convencionais e adicionalmente tratados com IL-7 e ou IL-15 adquirem um estado de resistência duradoura contra a infecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Interleucina-7

A Interleucina-7 (IL-7) foi inicialmente descrita em 1988 como um fator hematopoiético que promovia proliferação de células progenitoras da linhagem linfocitária B (NAMEN *et al.*, 1988a; NAMEN *et al.*, 1988b). Pouco tempo depois, vários autores observaram que IL-7 era capaz de agir como um potente agente coestimulador de células T maduras e imaturas, tanto em camundongos quanto em seres humanos (MORRISSEY *et al.*, 1989; CONLON *et al.*, 1989; WATSON *et al.*, 1989; OKAZAKI *et al.*, 1989; WELCH *et al.*, 1989; ARMITAGE *et al.*, 1990).

As principais células que produzem IL-7 são as células estromais dos órgãos linfoides primários (NAPOLITANO *et al.*, 2003; MAZZUCHELLI *et al.*, 2009). No timo e na medula óssea, a IL-7 promove proliferação e diferenciação de células da linhagem T e B respectivamente (OKAZAKI *et al.*, 1989; WEI *et al.*, 2000) e adicionalmente, é capaz de influenciar o desenvolvimento de células dendríticas no timo (VARAS *et al.*, 1998).

O receptor de IL-7 é composto por duas cadeias polipeptídicas, a cadeia alfa (IL-7R α) e a cadeia gama comum. A cadeia IL-7R α confere ao receptor uma alta afinidade de ligação a IL-7 e participa na transdução de sinal nas células alvo (SCHLUNS & LEFRANCOIS, 2003; BOYMAN *et al.*, 2007)

Deficiência genética na expressão de IL-7 ou em qualquer componente do receptor da IL-7 (IL-7R) resulta em um severo prejuízo na timopoiese e na sobrevivência de células T. A deficiência na expressão de IL-7R α no homem pode resultar em um quadro de imunodeficiência combinada severa, SCID, T (-), B (+) NK (+) (PUEL *et al.*, 1998) e a deficiência da expressão de IL-7 em camundongos promove uma deficiência severa das células B e T (von FREEDEN-JEFFRY *et al.*, 1995). Esses resultados sugerem que IL-7 é essencial na linfopoiese de células T humanas, no entanto, não é absolutamente necessária para o desenvolvimento de células B em seres humanos. A exigência de IL-7 no desenvolvimento e na sobrevivência de células T deve-se, entre outras coisas, o fato de que vias de pró-sobrevivência são induzidas pela estimulação com IL-7, particu-

larmente através da modulação da expressão dos membros da família Bcl-2 (LI *et al.*, 2010)

IL-7 é uma citocina essencial para sobrevivência células T *naïve* e não pode ser substituída por outras citocinas que também favorem a sobrevivência. (TAN *et al.*, 2001).

Estudos realizados *in vivo* em camundongos observaram que a sobrevivência e proliferação homeostática das células T CD4+ e T CD8+ *naïve* são dependentes de IL-7. Células do cordão umbilical humano também necessitam de IL-7 para a sobrevivência e proliferação das células T CD4+ inexperinetes (WEBB *et al.*, 1999; DARDALHON *et al.* 2001; HASSAN & REEN, 2001).

Pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam uma redução do número das células T CD4+ no sangue periférico, principalmente das células T CD4+ *naïve*, acompanhada do aumento dos níveis séricos de IL-7. Após a terapia com antirretroviral eficaz, ocorre o restabelecimento do número de células T CD4+ bem como o declínio nos níveis de IL-7 no soro dos pacientes (NAPOLITANO *et al.*, 2001).

Em estudos realizados com primatas não humanos, a administração de IL-7 induz um aumento absoluto dos linfócitos T CD4+ e T CD8 + no sangue periférico (FRY *et al.*, 2003). Em outro estudo realizado em macacos, doses supra-fisiológicas de IL-7 promoveram aumento semelhante de linfócitos T *naïve*, de memória central e efetores, e levou à conversão de células *naïve* para células com fenótipo de memória. Além disso, esses efeitos foram acompanhados pelo aumento da expressão de Bcl-2 em linfócitos T CD4+ e T CD8 + (MONIUSZKO *et al.*, 2004).

A IL-7 tem um papel importante da regulação da resposta imune após a entrada do antígeno (KIEPER *et al.*, 2002) e parece ser uma regulador chave na geração de células T de memória, processo dependente da sinalização de IL-7/IL-7R (KAECH *et al.*, 2003)

A IL-7R α (CD127) regula a expressão dos efeitos da IL-7 sobre as células T. CD127 é constitutivamente expresso em células T *naïve* e sua expressão é rapidamente reprimida após a ativação (SCHLUNS *et al.*, 2000; ALPDOGAN *et al.*, 2003). Em camundongos transgênicos para o receptor de células T (TCR), a expressão

de IL-7R α diminui acentuadamente durante a geração de células efetoras após a estimulação pelo antígeno específico (KAECH *et al.*, 2002). No entanto, a cadeia IL-7R α é re-expressa ou permanece na superfície no final da fase de expansão em uma minoria de células T, que representa aproximadamente 5-10% das células T efetoras expandidas, sugerindo que a expressão de IL-7R α tem um papel fundamental na geração de células T de memória (KAECH *et al.*, 2003).

Além da importância da IL-7 na linfopoiese de células B e T, essa citocina também se mostra importante na diferenciação de outros tipos celulares. O desenvolvimento e a maturação de células dendríticas (DC) no timo e suas funções como células apresentadoras de antígenos, assim como a diferenciação de monócitos periféricos em DC são, em parte, controladas por IL-7 (MARQUEZ *et al.*, 1995; TAKAHASHI *et al.*, 1997). Em camundongos, a terapia com IL-7 promove um aumento funções das DC. (FRY *et al.*, 2001).

A IL-7 é capaz de promover a geração de células ativadas por linfocina (LAK) e promover atividade citotóxica de células NK (NAUME *et al.*, 1992, 1993).

Em virtude das atividades biológicas de IL-7 descritas acima, vários pesquisadores passaram a avaliar experimentalmente o uso dessa citocina em diversas condições, como por exemplo, na reconstituição de células T necessária após quimioterapia e radioterapia (WILLIAMS *et al.*, 2007), no controle de neoplasias, na promoção de respostas imunes no curso de doenças infecciosas, como agente imunoterápico, (PELLEGRINI & MAK, 2010; MAEURER *et al.*, 2000), na geração de resposta imune de maior intensidade e de longa duração, como agente adjuvante (MELCHIONDA *et al.*, 2005; COLPITTS *et al.*, 2009; NANJAPPA *et al.*, 2008).

KOMSCHLIES e colaboradores (1994) relataram que em camundongos inoculados com uma linhagem de células de carcinoma renal, a administração de IL-7 promove aumento da resposta de células T e redução do número de metástases. Em seres humanos que exibiam câncer refratário ao tratamento convencional, a administração IL-7 recombinante resulta em uma expansão policlonal prolongada de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico. Esse efeito, que é decorrente do aumento da sobrevivência e da proliferação células T (SPORTÈS *et al.*, 2008) e poderia

resultar na melhoria da função imunológica em pacientes com imunidade comprometida.

SERETI e colaboradores (2009) avaliaram a segurança farmacológica e propriedades biológicas de IL-7 em pessoas indivíduos infectados pelo HIV. Em um estudo de fase I, esses autores relataram que uma única dose de rhIL-7, variando de 3 a 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, é bem tolerada, e tende a promover um aumento do número de células T CD4+ e CD8+ circulantes, predominantemente do fenótipo de memória central.

2.2. Interleucina 15

A Interleucina-15 (IL-15) foi inicialmente descrita simultaneamente por dois grupos de pesquisas (BURTON *et al.*; 1994; NAMEN *et al.*, 1988). BURTON e colaboradores (1994), estudando a patogênese da leucemia causada pelo vírus linfotrópico humano do tipo 1 (HTLV-1) observaram que uma linhagem célula da leucemia (HuT-102), que não exibia infecção viral, produzia um fator distinto de IL-2 capaz de induzir proliferação de células T, geração de células LAK e estimulação de células T CD8 citotóxicas de um linhagem de células de camundongo, CTLL-2. (GILLIS *et al.*, 1978). Esses autores denominaram esse fator IL-T. Por outro lado, GRABSTEIN e colaboradores (1994), avaliando sobrenadantes de cultura de células, observaram que no sobrenadante de uma linhagem células epiteliais de rim de símio, denominada CV-1/EBNA, havia um fator que eles denominaram de IL-15, que era capaz de induzir a proliferação de células CTLL-2. Esses grupos de pesquisa clonaram o cDNA de IL-15 a partir de células de linhagem humana ou de símio (BAMFORD *et al.*, 1996; GRABSTEIN *et al.*, 1994).

O receptor de IL-15 é composto por três cadeias polipeptídicas, que são denominadas alfa, beta e gama comum. A cadeia alfa é utilizada unicamente por IL-15, sendo diferente da cadeia alfa do receptor de IL-2, contudo, a cadeia beta é compartilhada entre o receptor de IL-15 e o de IL-2 (GIRI *et al.*, 1994; GIRI *et al.*, 1995). A transdução de sinal para as células alvo é realizada através das cadeias beta e gama comum (COSMAN *et al.*, 1995). A cadeia IL-15R α pode ser expressa na membrana de

células ou na forma solúvel (BUDAGIAN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2009). IL-2R α e IL-15R α têm diferentes papéis funcionais *in vivo*. Camundongos IL-2^{-/-} e IL-2R α ^{-/-} desenvolvem linfadenopatia, esplenomegalia e autoimunidade células T-dependentes (WILLERFORD *et al.*, 1995). Em contraste, camundongos deficientes em IL-15 ou IL-15R α não desenvolvem autoimunidade, mas apresentam linfopenia, especialmente em células T CD8⁺, e redução ou ausência no número de células T gama/delta ($\gamma\delta$), células NK e NKT (KENNEDY *et al.*, 2000). Ao contrário de IL-2, que é produzida principalmente por células T ativadas, o RNAm de IL-15 é constitutivamente expresso por uma grande variedade de tipos celulares e tecidos, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, queratinócitos, fibroblastos e células epiteliais de várias origens, células nervosas, rins, placenta, pulmão, coração e músculo esquelético (BUDAGIAN *et al.*, 2006).

Tanto em seres humanos quanto em camundongos, foram descritas duas isoformas do RNAm de IL-15 que diferem no tamanho e na sequência que codifica para o peptídeo sinal (GAGGERO *et al.*, 1999). Uma das isoformas de IL-15 (IL-15LSP) é caracterizada por um peptídeo sinal excepcionalmente longo de 48 aminoácidos. Em contraste, uma outra isoforma de IL-15 (IL-15SSP) tem um peptídeo sinal mais curto, de 21 aminoácidos (KURYS *et al.*, 2000). Os peptídeos sinais determinam o destino da proteína madura associada. Enquanto a IL-15SSP não entra no retículo endoplasmático e não é secretada, sendo armazenada no citoplasma, a IL-15LSP é encontrada no retículo endoplasmático, no complexo de golgi, e é secretada (GAGGERO *et al.*, 1999).

IL-15 é uma citocina pleiotrópica, que desenvolve vários papéis no sistema imune inato e adaptativo, incluindo o desenvolvimento, a ativação, e a sobrevivência de células imunes efectoras, especialmente NK, NKT e células T CD8⁺ (LODOLCE *et al.*, 1998; KENNEDY *et al.*, 2000). As células NK são conhecidas por sua contribuição inata em reconhecer e destruir as células infectadas e células tumorais (MEAZZA *et al.*, 2011).

Estudos realizados em camundongos revelam IL-15 e IL-15R α são indispensáveis para o desenvolvimento e diferenciação das células NK (MA *et al.*, 2006). IL-15 é capaz de aumentar a atividade citotóxica das células NK, bem como a produção de citocinas produzidas por células NK, como o interferon gama, IFN- γ , fator

estimulador de colônia de monócitos e granulócitos, GM-CSF, e fator de necrose tumoral, TNF- α (FEHNIGER & CALIGIURI, 2001).

A produção endógena de IL-15 por monócitos humanos é necessária para a produção ótima de IFN- γ por células NK. Essas células também são fundamentais na defesa contra diversos patógenos através do fornecimento de IFN- γ , já que o mesmo funciona como o fator de ativação de monócitos para várias atividades contra patógenos intracelulares (JAMES & NACY, 1993). IL-15 também é importante para a maturação de macrófagos, assim como de DC em resposta a infecções microbianas, controlando tanto a produção de IL-12, quanto à capacidade de resposta de células apresentadoras de antígenos a IL-12 (BUDAGIAN *et al.*, 2006). IL-15 aumenta a atividade fagocítica de monócitos e macrófagos, além de induzir a produção de fatores pró-inflamatórios como a IL-8 e proteína quimiotática de monócitos 1, MCP-1, (CARROLL *et al.*, 2008). IL-15 também tem efeitos sobre os neutrófilos, sendo capaz de aumentar a fagocitose e inibir a apoptose dessas células (BOUCHARD *et al.*, 2004; CASSATELLA & MCDONALD, 2000). Curiosamente, defeitos nestes tipos celulares não foram relatados em camundongos deficientes de IL-15 ou IL-15R α sugerindo que as interações IL-15/IL-15R podem participar, mas não são essenciais. (FEHNIGER & CALIGIURI, 2001).

ARMITAGE e colaboradores (1995) relataram o papel de IL-15 na modulação da atividade das células B. Esses autores observaram que IL-15 é capaz de induzir a proliferação de células B estimuladas com anticorpo anti-IgM e, em combinação com CD40, promover a produção e secreção de IgA, IgG1 e IgM. Em outro estudo realizado, observou-se que IL-15 inibe a apoptose, induzida por diferentes estímulos, de linfócitos B de camundongos e humanos (BULFONE-PAUS *et al.*, 1997). Estes efeitos sobre a sobrevivência e proliferação das células B podem ser proporcionados *in vivo* em consequência da produção de IL-15 por células dendríticas foliculares em centros germinativos (PARK *et al.*, 2004).

IL-15 exibe um papel importante na geração e/ou manutenção de células T de memória, sendo tal papel mais relevante para as células T CD8 $^{+}$ que para as células T CD4 $^{+}$. Essa diferença parece estar intimamente relacionada com os níveis de expressão do IL-15R. Células T CD4 $^{+}$ de memória expressam níveis mais baixos de IL-

2/IL-15R β que células T CD8⁺ de memória (van LEEUWEN *et al.* 2009). Camundongos IL-15 $\alpha^{-/-}$ apresentam um número normal de células T CD4⁺ de memória, corroborando a sugestão que IL-15 pode ser menos importante para a homeostase das células T CD4⁺ do que para células T CD8⁺ de memória (MA *et al.*, 2006). Talvez, no entanto, a realidade seja mais complexa, uma vez que em certas condições experimentais IL-15, tal como IL-7, parece influenciar na sobrevivência de células T CD4⁺ de memória (van LEEUWEN *et al.* 2009; OSBORNE & ABRAHAM, 2010).

ZHANG e colaboradores (1998) descrevem IL-15 como um potente estimulador de células T CD8⁺ CD44^{High} ou IL-2R β ^{High} *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos de IL-15 nas células T CD8⁺ *naïve* e de memória estão associadas com a expressão de Bcl-2 e Bcl-xL, proteínas com atividade anti-apoptótica.

Camundongos deficientes na expressão de IL-15 ou na expressão de IL-15 α exibem uma redução no número de células T CD8⁺ e células T CD8 de memória (CD44⁺) na periferia, linfonodos e baço (LODOLCE *et al.*, 1998; KENNEDY *et al.*; 2000). Interessantemente, camundongos deficientes na expressão de IL-15 α exibem também uma redução no número de células no timo, sugerindo que a atividade de IL-15R α não é substituível nesse órgão (LODOLCE *et al.*, 1998). Em camundongos deficientes em IL-15, a administração dessa citocina promove uma restauração do número de células T CD8⁺ e células T CD8⁺ de memória na periferia (KENNEDY *et al.*, 2000).

Devido suas propriedades biológicas de IL-15 descritas acima, tal como para IL-7, vários autores passaram a avaliar experimentalmente o uso dessas citocinas em diversas condições, como por exemplo, no controle de neoplasia, na promoção de respostas imunes no curso de doenças infecciosas, como agente imunoterápico, (MAEURER *et al.*, 2000), na geração de resposta imune de maior intensidade e de longa duração, como agente adjuvante (CARALOTA *et al.*, 2008).

CARALOTA e colaboradores (2008) avaliaram IL-15 como adjuvante no desenvolvimento de uma vacina contra HIV. Nesse estudo, os autores relataram que camundongos imunizados com plasmídeo codificando Gag de HIV-1 associado a um plasmídeo codificando IL-15 apresentaram um aumento significativo no número de células T CD8⁺ de memória central e efectoras. Em outro estudo, camundongos

imunizados com BCG (*Bacilo Calmette-Guérin*) em combinação com IL-15 e IL-7 quando desafiados pela infecção com *M. tuberculosis* exibiram resposta de células T CD4 e CD8 de memória mais intensa do que os controles injetados apenas com BCG, além da redução da carga microbiana nos pulmões (SINGH *et al.*, 2010).

MUNGER e colaboradores (1995) relataram que a administração de IL-15 exerce atividade antitumoral contra células MCA-205 (linhagem de fibrossarcoma) transplantadas experimentalmente em camundongos, provavelmente, devido a um aumento do número e da atividade funcional de células T e NK. Em outro estudo, alguns autores descreveram que a combinação de IL-15 e ciclofosfamida revela atividade antitumoral contra células de uma linhagem de rhabdomyosarcoma, também dependente de células NK e T CD8+ (CHAPOVAL *et al.*, 1998.)

A administração de IL-15 parece ocasionar menos efeitos tóxicos do que IL-2. KATSANIS e colaboradores, 1996, reportaram que a administração de IL-15 em camundongos levou ao aumento da atividade antitumoral após transplante singênico de medula óssea. Outro estudo relatou que após a administração de IL-15 houve aumento da atividade antitumoral, conseqüente ao aumento da função de células T e NK em camundongos portadores de tumor e em camundongos transgênicos para IL-15 desafiados com tumor (MUNGER *et al.*, 1995). Ambos os estudos relataram uma menor toxicidade de IL-15, quando comparada a IL-2.

2.3. A Leishmaniose Visceral

Leishmaniose visceral (LV) é uma doença transmitida a humanos e outros mamíferos por vetores e é causada por parasitas do complexo *Leishmania donovani*. Existem dois tipos epidemiológicos de LV: o tipo antroponótico e tipo zoonótico. No tipo zoonótico da LV, que é causada pelas espécies *L. infantum* e *L. chagasi*, sendo que alguns autores acreditam que essas duas espécies sejam sinônimas (LUKES *et al.*, 2007), o homem e o cão podem adquirir a infecção e desenvolver a doença, contudo, o último e o principal reservatório do protozoário (DEANE & DEANE, 1955; MORENO & ALVAR *et al.*, 2002). A infecção é transmitida de um indivíduo para outro indivíduo através da pi-

cada do inseto vetor, pertencente ao gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* (DESJEUX, 1996).

A incidência global da LV humana é estimada em meio milhão de casos por ano, sendo que 90 % dos casos ocorrem na Índia, Nepal, Bangladesh, Sudão e Brasil (DESJEUX, 2001; 2004).

No Brasil, a LV é causada pela *L. chagasi* e a transmissão do protozoário é realizada pela picada da fêmea do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis*, infectado pelo protozoário. No passado, a doença era considerada típica de ambientes rurais, no entanto, o número de casos vem aumentando em áreas urbanas e suburbanas em muitas cidades do país (COSTA *et al.*, 1990; JERONIMO *et al.*, 1994; MARZOCHI *et al.*, 1994, SILVA *et al.*, 2001; CORREA *et al.*, 2007).

As medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde para o controle da LV no Brasil consistem no tratamento de casos da doença humanos, controle do inseto vetor, identificação e eliminação de cães infectados e atividades educativas (BRASIL, 2009).

A identificação da infecção canina é feita indiretamente pela procura de anticorpos *anti-Leishmania*, no soro ou em eluato de sangue coletado em papel de filtro, através do ensaio de imunofluorescência indireta, IFAT (BRASIL, 2009). Provavelmente, porque parte dos cães que exibe resultado positivo no ensaio IFAT não exibe manifestações clínicas, nem sempre a remoção de infectados para o sacrifício é bem aceita pela comunidade em áreas endêmicas.

Uma vacina eficaz capaz de impedir a infecção/doença/infectividade no cão poderia contribuir para o controle da LV no homem e no cão (TESH, 1995; DYE, 1996). Apesar de duas diferentes vacinas já terem sido licenciadas no Brasil pelo Ministério da Agricultura, ainda não existem evidências, obtidas de um modo independente, indicando a eficácia dessas vacinas e, por isso, o Ministério da Saúde não recomenda o uso de tais vacinas para o controle da LV.

Em princípio, o tratamento de cães e seres humanos contra LV poderia ser realizado com as mesmas drogas. A maioria dos seres humanos que recebe o tratamento farmacológico específico, por exemplo, antimonial pentavalente ou anfotericina B, desenvolve cura clínica duradoura (COOK *et al.*, 1993) e não exibe novo

episódio da doença mesmo quando exposta a reinfecção. Já a maioria dos cães que desenvolvem a doença e que são tratados com antimonial pentavalente, anfotericina B ou pentamidina, mesmo na ausência da exposição à reinfecção, tende a exibir recaída (SLAPPENDEL & TESKE, 1997; MORENO *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999; BANETH & SHAW, 2002). Após o tratamento e o desenvolvimento da cura clínica, os cães passam a apresentar uma resposta linfoproliferativa frente à estimulação *in vitro* com antígenos do lisado do parasito (MORENO *et al.*, 1999; RHALEM *et al.*, 1999), no entanto, com a recaída os animais perdem a capacidade de montar tal resposta.

Acredita-se que o processo de controle sobre a infecção por *Leishmania* no cão dependa do estabelecimento de uma resposta imune celular específica do tipo Th1 (PINELLI *et al.*, 1994; PINELLI *et al.*, 1995; RHALEM *et al.*, 1999), 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 desenvolver manifestações clínicas devido à recaída ou reinfecção. Tendo em vista as citocinas IL-7 e IL-15 serem capazes de promover resposta imune de memória (LENZ *et al.*, 2004; BRADLEY *et al.*, 2005; SURH & SPRENT, 2008), seria interessante avaliar se a administração das mesmas em cães com LV, submetidos a quimioterapia convencional seguido de cura clínica, promoveria um estado de resistência duradouro que impedisse recaída e/ou eliminasse a capacidade do cão de transmitir *Leishmania* para o flebótomo.

Interessantemente, até o presente momento, ainda não foram descritas na literatura científica, a clonagem, produção, avaliação de atividades biológicas, atividades tóxicas e utilidade na modulação da resposta imune ou geração de células de memória das citocinas IL-7 e IL-15 caninas.

Visando a avaliação, em um futuro próximo, da utilidade de IL-7 e/ou IL-15 caninas em um método imunoterápico para LV canina, no presente trabalho, foram descritas a clonagem, a produção e avaliação de algumas atividades biológicas da IL-7 e IL-15 caninas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Produzir as citocinas IL-7 e IL-15 caninas recombinantes biologicamente ativas (rca-IL-7 e rca-IL-15), visando futuros estudos de imunomodulação em cães.

3.2. Específicos

- Clonar o cDNA e produzir rca-IL-7 e rca-IL-15 biologicamente ativas em *E. coli*.
- Avaliar a capacidade de rca-IL-7 e rca-IL15 de induzir proliferação em células mononucleares do sangue periférico (CMNSP) de cães.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Produção de IL-7 e IL-15 caninas recombinantes em *Escherichia coli*

4.1.1. Clonagem dos cDNAs DE IL-7 e IL-15 caninas em plasmídeo pcR2.1-TOPO

Para produção de rca-IL-7 e rca-IL-15 a partir de *E. coli*, os cDNAs de IL-7 e de IL-15 caninas foram separadamente clonados em plasmídeo pcR2.1-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, EUA) em nosso laboratório, gerando as construções pcR2.1-TOPO-ca-IL-7 e pcR2.1-TOPO-ca-IL-15, respectivamente (DOS SANTOS, L. R. *et al*, dados não publicados). Resumidamente, a partir de um fragmento de baço, oriundo de um cão de porte médio (10 a 15 kg) estimulado com 2 mg de concanavalina A (Con A), os cDNAs que codificam as proteínas inteiras IL-7 e IL-15 caninas foram obtidos por transcrição reversa (RT), usando-se oligonucleotídeos desoxitimidina trifosfato (oligo-dT), e amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos (IL-7, a montante 5' CATCATKACYACRCCRCCTCC, a jusante 5' ACCAGGATGCATTCTGTAAGTTCTAGG; IL-15, a montante 5' TTGCCATAGCCAGCTCTTCTTCA, a jusante 5' AAGACGCTGGTTAATCGCAGAAAT). Em seguida, os cDNAs foram ligados ao plasmídeo pcR2.1-TOPO, seguindo-se as recomendações do fabricante (Invitrogen). O sucesso da clonagem foi confirmado através de digestão com endonucleases e sequenciamento de DNA dos insertos.

4.1.2. Subclonagem dos cDNAs de IL-7 e IL-15 caninas em plasmídeo pRSET

Os cDNAs codificantes das proteínas maduras IL-7 e IL-15 do cão foram subclonados, separadamente, em plasmídeo pRSET (Invitrogen), usando-se as construções pcR2.1-TOPO-ca-IL-7 e pcR2.1-TOPO-ca-IL-15 como molde para PCRs e os oligonucleotídeos iniciadores específicos (IL-7, a montante 5'-TCGGGATCCACATGGTCCATGTTTCTTTAG, a jusante 5'-TCGCTCGAGTCAATGTTCTTTAGAGC; IL-15, a montante 5'-AGTACGGATCCTAATTGGCAGGACGTGATA, a jusante 5'-AATCAGAAGCTTTCAAGAGGAGTTGATGAA). Os oligonucleotídeos iniciadores a

montante e a jusante foram sintetizados com um sítio de restrição para as endonucleases *BamHI* e *HindIII*, respectivamente. As PCRs foram realizadas com 5 μ L de tampão 10X da DNA polimerase (15 mM $MgSO_4$), 1 μ L de oligonucleotídeo iniciador a montante a 20 mM, 1 μ L de oligonucleotídeo a jusante a 20 mM, 0,5 μ L de DNA polimerase *Pwo SuperYield* (5 U/ μ L, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha), 1 μ L de desoxinucleotídeos (trifosfato de desoxiguanosina, trifosfato de desoxiadenosina, trifosfato de desoxitimidina, trifosfato de desoxicitidina, dNTPs) a 25 mM cada (Invitrogen) e aproximadamente 20 ng de DNA plasmídeo molde em um volume final de 50 μ L. PCR para amplificação do cDNA da IL-7 e da IL-15 foram realizadas nas seguintes condições: 2 min a 95°C, 35 ciclos (30 segundos a 95°C, 45 segundos a 50°C e 30 segundos a 72°C) e 7 min a 72°C e 2 min a 94°C, 35 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 56°C e 1 min a 72°C) e 7 min a 72°C, respectivamente.

Com o objetivo de gerar extremidades coesivas para a ligação entre o produto da PCR e o sítio múltiplo de clonagem do vetor, aproximadamente 2 μ g do cDNA codificante de IL-7 ou IL-15 purificados e 2 μ g de DNA do plasmídeo pRSET foram separadamente digeridos, sucessivamente, com *BamHI* em tampão Tango (Tango; Tris-acetato a 33 mM, pH 7,9, $Mg_3(PO_4)_2$ a 10 mM, CH_3COOK a 66 mM e BSA a 0,1 mg/mL, Fermentas, Hanover, EUA) e *HindIII*, em tampão R (Tris-HCl a 10 mM, pH 8,5, $MgCl_2$ a 10 mM, KCl a 100 mM e BSA a 0,1 mg/mL, Fermentas, Hanover, EUA). As reações foram realizadas em um volume de 40 μ L, a 37° C, por 2 h. Os produtos de digestão foram purificados a partir de gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio (Sigma-Aldrich), usando-se um “kit” QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemanha) e seguindo-se as recomendações do fabricante. Uma estimativa da concentração DNA dos produtos de digestão foi realizada em gel de agarose com brometo de etídio.

As reações de ligação foram realizadas, separadamente, em um volume de 15 μ L, a 22°C, durante 16 h. Para isso, foi usada uma proporção de 3:1, entre moléculas de inserto digerido e moléculas do plasmídeo digerido, e 1U de T4 ligase (Fermentas) em tampão de ligação (400 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 5 mM ATP - pH 7,8 a 25°C). Os produtos da ligação foram usados para transformar *E. coli* da linhagem TOP10 (Invitrogen) preparada quimicamente competente. Um volume 1,5 μ L de cada

produto de ligação foi misturado com uma alíquota de 100 µL de *E. coli* em um microtubo. Os microtubos foram incubados, sucessivamente, por 30 minutos sob o gelo, por 1 minuto a 42°C e 2 minutos sob o gelo. Em cada tubo foi acrescentado 1 mL de meio de cultura Luria-Bertani (LB, bacto-triptona a 1%, extrato de levedura a 0,5%, NaCl 1%, pH 7,0). Os microtubos foram incubados por 1 h, a 37°C e a 250 rpm. Em seguida, placas de petri com meio de cultura LB-ágar (LB caldo, 1,5% p/v agar – Invitrogen), contendo ampicilina a 100 µg/mL (Sigma-Aldrich), foram semeadas com amostras de 100 µL de suspensão de bactéria e cultivadas por 16 h a 37°C.

4.1.3. Seleção de clones de *Escherichia coli* contendo as construções pRSET-ca-IL-7 e pRSET-ca-IL-15

A partir das placas de petri, uma amostra de bactérias de cada uma de 10 colônias de *E. coli* transformadas com produto de ligação cDNA de IL-7 ou IL-15 e plasmídeo pRSET foi inoculada em 5 mL de meio de cultura LB com ampicilina a 100 µg/mL, depois incubada por cerca de 16 h, a 37°C e 250 rpm. Um volume de 1,5 mL de cada suspensão bacteriana foi usado, separadamente, para purificação de plasmídeo (mini-preparação) pelo método de lise alcalina (SAMBROOCK *et al.*, 2001). No final, cada sedimento de DNA plasmidial foi ressuspenso em 50 µL de H₂O deionizada autoclavada contendo 20 µg/mL de RNase A (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA).

Amostras de plasmídeo purificado foram submetidos à digestão sucessiva por *BamHI* e *HindIII*, essencialmente, conforme descrição prévia. No final, os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e a documentação foi realizada usando-se um sistema Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, EUA).

4.1.4. Sequenciamento dos insertos codificantes de ca-IL-7 e ca-IL-15 em pRSET

Uma amostra de plasmídeo compatível com a construção pRSET- ca-IL-7 e outra compatível com a construção pRSET-ca-IL-15 foram submetidas ao sequenciamento de DNA, usando-se oligonucleotídeos iniciadores universais, um a montante e outro a jusante, no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Plataforma de sequenciamento de DNA, FIOCRUZ, Salvador, BA). Os produtos das reações de sequenciamento foram fracionados em sequenciador *ABI Prism*, modelo 3100 (Applied Biosystems) e analisados através do programa SeqAnalysis, versão 5.1 (Applied Biosystems).

4.1.5. Produção de ca-IL-7 e ca-IL-15 recombinante em *Escherichia coli*

Volumes de 5 litros de cultura de *E. coli* da cepa BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) transformada com a construção plasmídeo pRSET-ca-IL-7 ou pRSET-ca-IL-15, foram obtidos.

Para a geração de pré-inóculos, uma amostra de uma colônia de BL21(DE3)pLysS-pRSET-ca-IL-7 ou BL21(DE3)pLysS-pRSET-ca-IL-15, obtida de placa de petri, foi inoculada, separadamente, em um volume de 50 mL de meio de cultura LB, contendo ampicilina a 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) e cloranfenicol a 35 µg/mL (Sigma-Aldrich), em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL. Os frascos *Erlenmeyer* foram incubados por cerca de 16 horas, a 37°C, sob agitação constante a 250 rpm, em uma agitadora orbital (Orbit Environ Shaker, Lab-Line, Seattle, EUA). Cada suspensão bacteriana resultante foi usada para inocular 5 litros de meio de cultura LB, contendo ampicilina a 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) e cloranfenicol a 35 µg/mL (Sigma-Aldrich), de modo a atingir uma densidade óptica (D.O.) a 600 nm de valor próximo ou igual a 0,1. As suspensões bacterianas resultantes foram incubadas a 37° C, sob agitação constante a 250 rpm, até o momento em que a D.O. a 600 nm alcançou o valor entre 0,4 e 0,6. A partir daí, para a indução da produção de proteína recombinante, isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo (IPTG; Invitrogen) foi acrescentado ao meio de cultura para alcançar uma concentração final de 0,1 mM. Três horas após a indução com IPTG, cada suspensão de bacteriana foi submetida à centrifugação a 5.000 x g, por 15 minutos e a

4° C. Os sedimentos bacterianos foram pesados e armazenados a -20°C até o momento da purificação.

4.1.6. Purificação e renaturação de rca-IL-7 e rca-IL-15 produzidas em *Escherichia coli*

Em tubos de polipropileno de 50 mL, cada sedimento bacteriano, com cerca de 8 g, resultante do cultivo 5 litros de BL21(DE3)pLysS-pRSET-ca-IL-7 ou de BL21(DE3)pLysS-pRSET-ca-IL-15, foi ressuspenso com auxílio de um agitador vórtex (Labnet, Woodbridge, EUA), em tampão contendo Na₂HPO₄ a 20 mM, NaCl a 500 mM, Imidazol a 20 mM, pH 7,4. Para cada grama de sedimento bacteriano, foram utilizados três mililitros de tampão de lise e acrescentada lisozima para atingir uma concentração final de 1 mg/mL (Sigma-Aldrich). Os tubos foram incubados por 20 minutos sob temperatura ambiente. Posteriormente, para auxiliar no processo de lise bacteriana, foram adicionados quatro miligramas de ácido desoxicólico (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) para o volume de suspensão correspondente a cada grama do sedimento bacteriano original. As suspensões foram incubadas durante 30 minutos sob temperatura ambiente. Visando à fragmentação de DNA genômico das bactérias, cada uma das suspensões foi sonicada (seis pulsos de 200 Watts, cada um com duração de 20 segundos e intervalo de 1 minuto entre cada dois pulsos consecutivos), sob o gelo (Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA). Cada suspensão foi submetida à centrifugação por 15 minutos, 17.000 x g e a 4° C. O sedimento resultante da centrifugação foi solubilizado em tampão contendo Na₂HPO₄ a 200 mM, NaCl a 500 mM, Imidazol a 20 mM, pH 7,4 e 8M de ureia. Uma vez que rca-IL-7 e rca-IL-15 codificadas pelas construções pRSET-ca-IL-7 e pRSET-ca-IL-15, respectivamente, possuem uma cauda de seis histidinas na extremidade amina, acrescentada pelo plasmídeo pRSET, as proteínas solubilizadas foram fracionadas em colunas de afinidade de Sepharose-níquel (HisTrap) de 1 mL (General Electrics Healthcare, Uppsala, Suécia), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, após os sedimentos contendo rca-IL-7 e rca-IL-15 serem solubilizados, foram aplicados nas colunas previamente equilibradas com tampão contendo Na₂HPO₄ a 20 mM, NaCl a 500

mM, Imidazol a 20 mM, pH 7,4 e 8 M de ureia. Em seguida, para remoção de lipopolissacarídeos (LPS), cada coluna foi lavada com 50 mL de tampão contendo NaH_2PO_4 a 20 mM, NaCl a 500 mM, Imidazol a 31,5 mM, 8M de ureia e Triton X-114 a 0,1% (Fluka, Biochemika, France) pH 7,4; a 4°C (REICHELT, 2006). Finalmente, as proteínas foram eluídas com tampão contendo, Na_2HPO_4 a 20 mM, NaCl a 500 mM, Imidazol a 500 mM, pH 7,4 e 8 M de ureia. As frações cromatográficas contendo rca-IL-7 foram reunidas e submetidas a um processo de renaturação por diálise. Para isso, a solução contendo IL-7 em tampão de eluição foi submetida a sete banhos de diálise a 4° C, sendo cada banho contra os tampões indicados na Tabela I.

Tabela I. Banhos de diálise para renaturação de rca-IL-7 produzida em *E. coli*

Dia	Tampão fosfato pH 7,4	Molaridade			
		NaCl	Ureia	Ditiotreitol	Arginina
1°	0,01	0,15	8	5	-
2°	0,01	0,15	6	2,5	-
3°	0,01	0,15	4	1,5	-
4°	0,01	0,15	2	1	-
5°	0,01	0,15	-	1	-
6°	0,01	0,15	-	-	-
7°	0,01	0,15	-	-	0,5

As frações cromatográficas contendo rca-IL-15 foram reunidas e submetidas à diálise contra PBS e concentrações decrescentes de ureia realizada em três banhos a 4° C. Após a diálise, a fração solúvel obtida após a centrifugação a 17.000 x g durante 15 minutos a 4° C, foi armazenadas, em PBS. Alíquotas de rca-IL-7 e rca-IL-15 solúveis foram armazenadas a -20°C até o momento de uso. Amostras das proteínas foram coletadas em cada etapa da purificação para análise por eletroforese em gel de poli-acrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

A mensuração da concentração protéica de IL-7 foi realizada a partir da comparação em gel de poli-acrilamida (SDS-PAGE) com padrão de BSA, enquanto a

concentração de IL-15 foi mensurada pelo método de Lowry (LOWRY, 1951) modificado.

4.2. Análise da atividade biológica de rca-IL-15

Para avaliar a atividade biológica de IL-7, uma alíquota de células, dependentes de IL-7, de uma linhagem de linfócitos B de camundongo BALB/c.xid (TIB239), foi adquirida da *American Type and Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA). Durante os experimentos para a expansão das células TIB239, infelizmente, ocorreu contaminação bacteriana da cultura e os ensaios com o uso dessas células não puderam ser realizados.

Para avaliar a atividade biológica de IL-15 foram utilizadas células, dependentes de IL-2, de uma linhagem de linfócitos T CD8 citotóxicos (CTLL-2, TIB-214, ATCC) de camundongo C57BL/6. Células CTLL2 também são capazes de proliferar após a estimulação com IL-15 (GRABSTEIN, *et al.*, 1994). As células CTLL-2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), suplementado com piruvato de sódio a 2 mM (Sigma-Aldrich), L-glutamina a 2 mM (Sigma-Aldrich), HEPES a 10mM (Invitrogen), 10% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen) e 10% de sobrenadante de esplenócitos de ratos estimulados por três dias com 5 µg de Con A, denominado T-STIM (usado na cultura como fonte de IL-2). Quando estavam em fase exponencial de crescimento, as células foram lavadas duas vezes com 10 mL de solução salina balanceada de Hanks (HBSS, Sigma-Aldrich), sendo centrifugadas por 10 minutos, a 900 rpm a 4° C, cada vez. As células foram ressuspensas em RPMI 1640 suplementado e a concentração das células viáveis foi determinada em câmara de Neubauer após mistura com azul de Trypan (Sigma-Aldrich). Em seguida, a concentração foi ajustada para 1×10^5 células/mL e um volume de 100 µL da suspensão de células foi colocado em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Corning Incorporated Life Sciences, Acton, MA, EUA). Em triplicata de poços foram acrescentados um volume de 100 µL de RPMI 1640 suplementado, RPMI 1640 suplementado contendo T-STIM em diluições quadruplas de 1:2 a 1:2048 (controle positivo) ou RPMI 1640 suplementado contendo rca-IL-15 purificada nas concentrações de 1,8, 7,8, 32,2, 125, 500 e 2000 ng/mL. A

placa de microtitulação foi incubada por 24 h, a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Depois disso, em cada poço, foram adicionados 30 µL de meio RPMI suplementado contendo 1 µCi de timidina[H]³⁺ (Amersham Biosciences). Após 24 h de incubação nas condições anteriores, as células foram coletadas em filtros de fibra de vidro (Packard, Meriden, EUA) e a emissão de partículas betas foi avaliada durante o período de um minuto (cpm), usando-se um aparelho Matrix 9600 Direct Beta Counter (Packard). Os resultados foram expressos pelas médias aritméticas dos valores de cpm obtidos em cada triplicatas de poços.

4.3. Animais

Foram utilizados oito cães saudáveis, de porte médio, com idade de 1 a 2 anos, sendo quatro machos e quatro fêmeas, sem raça definida. Os cães foram mantidos no canil experimental do CPqGM/FIOCRUZ, conforme as Boas Práticas de Experimentação Animal preconizadas para a espécie (OLFERT *et al.*, 1993) e de acordo com as normas de experimentação animal da Fundação Oswaldo Cruz. Os cães foram vermifugados contra helmintos e vacinados contra cinomose, hepatite contagiosa, adenovirose, parvovirose, leptospirose (*canícola + icterohaemorrhagiae*) e raiva (Canigen, Virbac).

Um volume de cerca de 40 mL sangue foi coletado de cada animal, pela veia jugular, em uma seringa com 500 UI de heparina sódica (Eurofarma, São Paulo, Brasil).

4.4. Avaliação da capacidade de rca-IL-7 e rca-IL-15 de estimular células mononucleares de sangue periférico (CMNSP) de cães

4.4.1. Obtenção de CMNSP

Cada amostra de cerca de 40 mL de sangue foi diluída de 1:2 em HBSS (Sigma-Aldrich) tamponada com 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano-sulfônico, pH 7,0 (HEPES; Invitrogen, HBSS-HEPES). Amostras de sangue diluído de 1:2 foram colocadas cuidadosamente sobre um volume de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) em tubos de polipropileno de 50 mL. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos, a 800 g e a 20°C, e as CMNSP foram transferidas para outro tubo. As CMNSP foram lavadas três vezes com HBSS-HEPES, sendo centrifugadas por 15 minutos, a 600 x g e a 20°C entre as lavagens. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com L-glutamina (Sigma-Aldrich) a 2 mM, HEPES (Invitrogen) a 10mM, 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) a 10 µM, gentamicina a 50 µg/mL (Nova Farma Ltda., Goiás, Brasil) e 10% de soro bovino fetal (SBF, Invitrogen) e as concentrações celulares foram determinadas, usando-se o mesmo método descrito previamente para as células CTLL2, e ajustadas para 2×10^6 /mL.

4.4.2. Avaliação da capacidade de rca-IL-7 e rca-IL-15 de estimular CMNSP, pré-ativadas, de cães

Dez milhões de CMNSP de cada um dos oito cães, obtidas conforme descrição acima foram ressuspensas em 20 mL de meio RPMI 1640 suplementado como descrito no experimento anterior contendo fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich) a 100 µg/mL e cultivadas em um frasco de 75 cm² por três dias, a 37°C e em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Depois disso, a cada frasco de cultura, foram adicionados 20 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 5 % de sobrenadante de células COS-7 transfectadas com plasmídeo que codifica IL-2 canina (pcDNA3.1-ca-IL-2), previamente produzido em nosso laboratório (Pereira, 2006), e as células foram ressuspensas. De cada suspensão de células com volume de 40mL, 20 mL foram transferidos para um novo frasco de 75

cm². Os dois frascos de cultura foram incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 24 h. Para remover a PHA e IL-2, os 40 mL de suspensão de linfoblastos de cada cão foram transferidas para um tubo de polipropileno de 50 mL. As células foram, então, lavadas três vezes com 5 mL meio RPMI 1640 suplementado, centrifugando-se por 5 minutos a 140 x g durante as lavagens. A concentração de células viáveis foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, usando-se azul de Trypan (Sigma-Aldrich), e ajustada em 2×10^6 /mL.

Em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Corning), um volume de 100 µL de suspensão de linfoblastos (2×10^5 células) de cada cão foi colocado em cada um de 18 poços. Para células de cada cão, a triplicatas de poços, foram acrescentados 100 µL/poço de RPMI suplementado ou RPMI suplementado contendo rca-IL-7 a 20 ou 40 ng/mL ou contendo rca-IL-15 a 31,2, 125 ou 500 ng/mL. As placas de microtitulação foram incubadas por 72 h a 37° C, em atmosfera úmida com CO₂ a 5 %, sendo que 18 horas antes do término do cultivo, 30 µL de RPMI 1640 suplementado contendo 1 µCi de timidina[³H] (Amersham Biosciences) foram acrescentados a cada poço. As placas foram congeladas a -20° C até a coleta de células e contagem das partículas beta, conforme descrição acima.

4.4.3. Avaliação da capacidade de rca-IL7 e rca-IL-15 de induzir proliferação de CMNSP de cães sem estímulo prévio ou concomitante

Volumes 100 µL de suspensão de CMNSP, a 2×10^6 células/mL, de cada um dos sete cães foram colocados em poços de placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Corning). Em cada triplicata de poços, foi acrescentado um volume de 100 µL/poço de meio RPMI 1640 suplementado ou RPMI 1640 suplementado contendo rca-IL-7 a 20 ou 40 ng/mL ou contendo rca-IL-15 a 31,2, 125 ou 500 ng/mL. As placas de microtitulação foram incubadas por 4, 6, 8, 10, 12 ou 14 dias a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Dezoito horas antes do termino do cultvo, 30 µL de meio RPMI suplementado contendo 1 µCi de timidina[³H] foram acrescentados a cada poço. As placas foram mantidas a -20° C até a

coleta de células e contagem das partículas beta, conforme descrição acima.

4.5. Análise estatística

Uma vez que a distribuição de valores de cpm (contagem de cintilação por minuto), em ensaios de incorporação de timidina [H]³⁺ para avaliar proliferação de linfócitos, não é normal (JENSEN *et al.*, 1981; GOLUBEV, 2009) a comparação estatística entre cpm obtida de células submetidas a tratamentos diferentes foi realizada através de teste estatístico, não paramétricos, de Friedman, que leva em consideração medidas repetidas, seguido de pós-teste de Dunns. Os valores de cpm foram sumarizados pela mediana e percentis 25 e 75.

5. RESULTADOS

5.1. Produção de rca-IL-7 e rca-IL-15

Visando a obtenção para futuro uso em estudos com o objetivo de modular respostas imunes em cães, no presente trabalho, foram realizadas clonagem, expressão, purificação e avaliação de atividades funcionais de rca-IL-7 e rca-IL-15, conforme descritas a seguir.

5.1.1. Clonagem de rca-IL-7 e rca-IL-15

A partir de um clone de *E.coli* TOP10 transformada por pcR2.1-TOPO-ca-IL-7 ou pcR2.1-TOPO-ca-IL-15 foi realizada amplificação por PCR do cDNA codificante da proteína madura de IL-7 ou IL-15 do cão, respectivamente. Após a digestão dupla do cDNA de IL-7 e plasmídeo pRSET por *Bam*HI e *Hind*III ou do cDNA de IL-15 e pRSET por *Bam*HI e *Hind*III, foram realizadas as ligações do cDNA de IL-7 ou de IL-15 a pRSET. Os produtos de cada ligação foram usados para transformar *E.coli* TOP10. Dez clones de *E.coli* TOP10 transformados pelo produto de ligação IL-7 e pRSET ou IL-15 e pRSET, tiveram plasmídeo purificado e analisado por digestão enzimática (*Bam*HI e *Hind*III) e eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio. Dos 10 clones de *E. coli* TOP10 transformadas com produto de ligação do cDNA de IL-7 e pRSET ou cDNA de IL-15 e pRSET, 4 e 3 clones exibiam plasmídeo compatível com a presença de inserto de inserto de IL-7 (uma banda com cerca de 417 pb) e de IL-15 (uma banda com cerca de 345 pb), respectivamente (dados não mostrados). Uma alíquota de plasmídeo compatível com a presença do inserto de IL-7 ou de IL-15 foi submetida ao sequenciamento de nucleotídeos e os resultados obtidos foram comparados com as sequências depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As sequências dos insertos de cDNA IL-7 e IL-15 obtidas revelaram 100 % de similaridade às sequências que codificam a proteínas maduras IL-7 e IL-15 caninas contidas nos arquivos com número de acesso DQ845341 e NM001197188, respectivamente (dados não mostrados).

5.1.2. Purificação de rca-IL-7 e rca-IL-15

A produção de rca-IL-7 e rca-IL-15 foi realizada em *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformada com a construção plasmideal pRSET-ca-IL-7 ou pRSET-ca-IL-15. Como em ensaios preliminares observou-se que rca-IL-7 e rca-IL-15 eram produzidas em *E. coli* BL21(DE3)pLysS na forma insolúvel, sedimentos bacterianos obtidos após indução da expressão de cada uma das proteínas recombinantes através de IPTG foram processados visando a obtenção de corpúsculos de inclusão (KLIER *et al.*, 1982; MARSTON, 1986). Após a solubilização dos corpúsculos de inclusão contendo rca-IL-7 ou rca-IL-15 em tampão com ureia, aproveitando-se do fato de que o plasmídeo pRSET acrescenta uma cauda de seis histidinas na extremidade amina de cada uma das proteínas recombinantes, as proteínas foram purificadas através de cromatografia de afinidade usando-se colunas de Sepharose queladas por níquel. Depois disso, rca-IL-7 purificada foi renaturada através de diálise em tampão contendo concentrações decrescentes de ureia e DTT. Na parte final da diálise, foi acrescentada arginina ao tampão. Para renaturação de rca-IL-15, após purificação cromatográfica, apenas diálise em tampão com concentração decrescente de ureia foi utilizada. A análise de uma amostra de rca-IL-7 renaturada por SDS-PAGE mostrou uma banda principal com peso molecular de aproximadamente 21 kDa (Figura 1A). A avaliação de uma amostra de rca-IL-15 renaturada por SDS-PAGE revelou duas bandas principais, uma com peso molecular de aproximadamente 17 kDa e outra com 21 kDa (Figura 1B). No final do processo, a rca-IL-7 foi obtida na concentração de 4 µg/mL e a rca-IL-15 na concentração de 500 µg/mL.

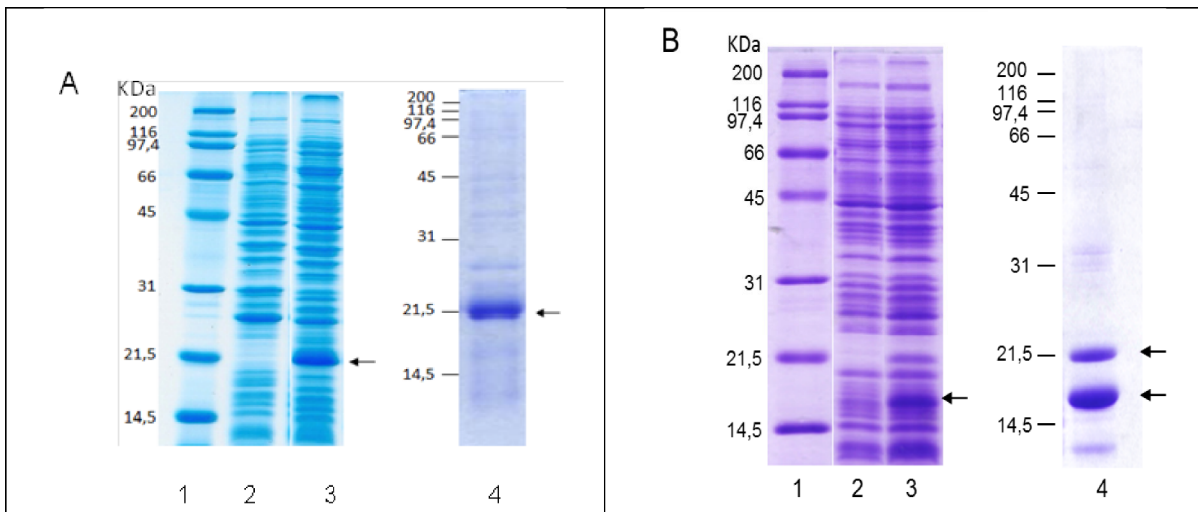


Figura 1. Expressão e avaliação de rca-IL-7 e rca-IL-15 purificadas e renaturadas por SDS-PAGE. A: raia 1, marcadores de peso molecular; raia 2, expressão de BL21(DE3)pLysS transformada com pRSET sem inserto; raia 3, expressão de BL21(DE3)pLysS transformada com pRSET-ca-IL-7; raia 4, rca-IL-7 purificada. **B:** raia 1, marcadores de peso molecular; raia 2, expressão de BL21(DE3)pLysS transformada com pRSET sem inserto; raia 3, expressão de BL21(DE3)pLysS transformada com pRSET-ca-IL-15; raia 4, rca-IL-15 purificada.

5.2. Avaliação da atividade biológica de rca-IL-15 em células CTLL-2

Para avaliar a atividade funcional da rca-IL-15 purificada, foi realizado o ensaio biológico clássico no qual se utilizam células da linhagem CTLL-2 que são capazes de proliferar após estimulação por IL-2, incluindo a citocina do cão, ou IL-15 de várias espécies de mamíferos (GILLIS & WATSON, 1980; CERRUTI-SOLA *et al.*, 1984; XIONG *et al.*, 2005; DEAN *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2009). Nesse ensaio, as células CTLL-2 foram cultivadas em meio de cultura, sem estimulantes adicionais, para determinação da proliferação basal (controle negativo) ou na presença de um sobrenadante de esplenócitos de rato estimulados com Con A (T-STIM, controle positivo) em diluições seriadas quádruplas de 1:4, 1:16, 1:64, 1:256; 1:1024 e 1:4096. Além disso, rca-IL-15 foi avaliada em várias concentrações. Os valores de cpm, correspondentes a média de triplicatas, obtidos para as células CTLL-2 cultivadas apenas com meio foi de 522 e com T-STIM, da maior para a menor concentração, foram de 44863; 43441; 16986; 4538; 927 e 408 (Figura 2A), gerando índices de proliferação de 0,8; 1,7; 8,9; 29,3; 83,7 e 95,3 (Figura 2B). Em células CTLL-2

estimuladas por rca-IL-15 nas concentrações de 1000 ng/mL, 250 ng/mL, 62,5 ng/mL, 15,6 ng/mL, 3,9 ng/mL e 0,9 ng/mL exibiram os seguintes valores de média de cpm 47370, 50810; 21735; 16605; 14476 e 6642 (Figura 2C), proporcionando os índices de proliferação de 88,4; 98,1; 41,8; 31,6; 27,7 e 12,7 (Figura 2D), respectivamente. Portanto, os valores de cpm obtidos para células estimuladas com rca-IL-15 são compatíveis com uma curva dose-resposta. Interessantemente, a concentração rca-IL-15 que promoveu a maior estimulação foi a de 250 ng/mL, acima dessa concentração a citocina, aparentemente, começa inibir a proliferação das células CTLL-2.

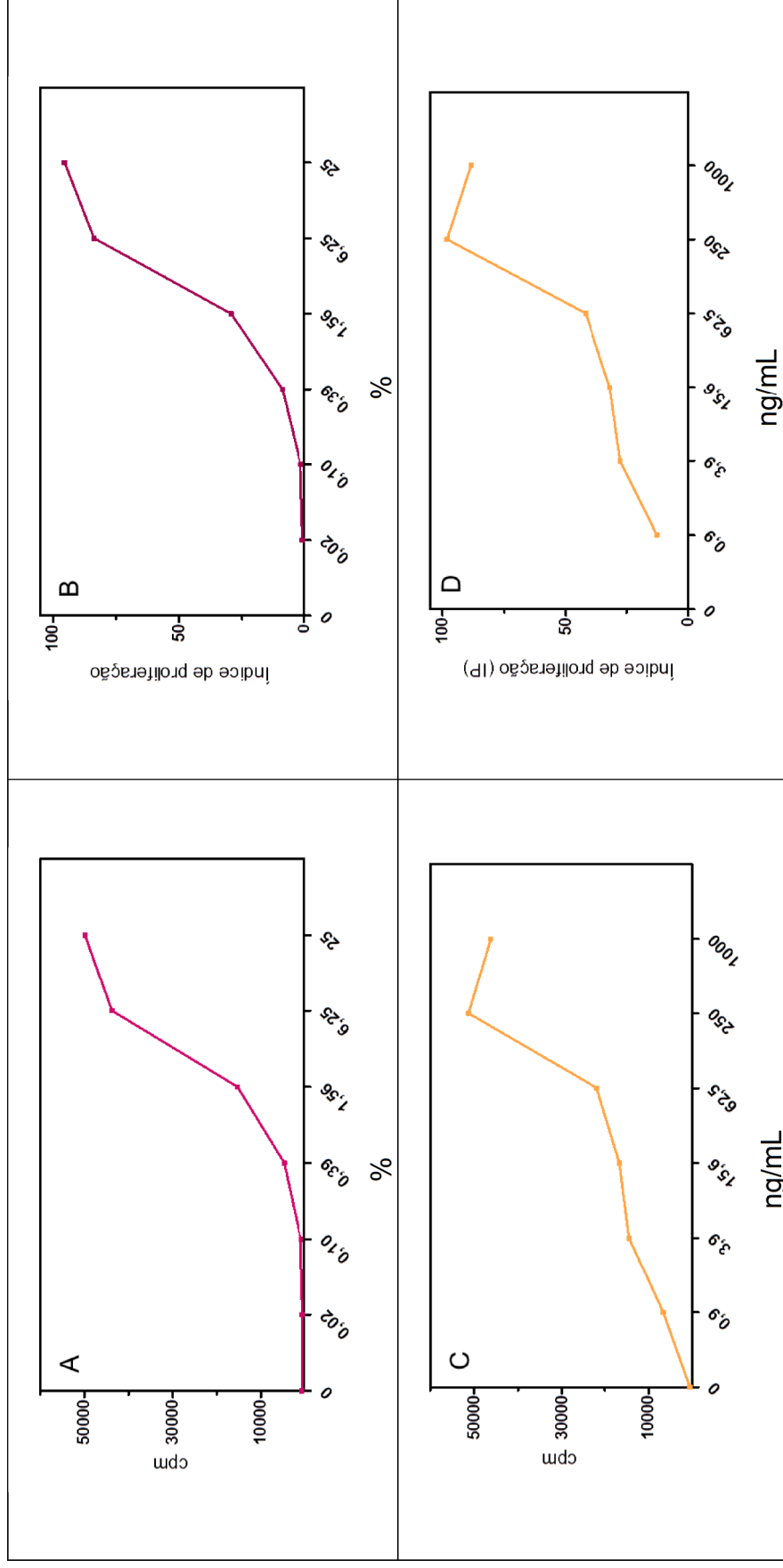


Figura 2. Avaliação da atividade biológica de rca-IL-15 purificada. Células CTLL-2 foram colocadas em placas de microtitulação de 96 poços, 10.000 células/poço. Em triplicatas de poços, as células foram cultivadas por 48h somente com meio (zero), com diferentes concentrações de T-STIM (%) ou diferentes concentrações de rca-IL-15 (ng/mL). Durante as últimas 24 horas, 1 μ Ci de timidina [H]³⁺ foi acrescentado a cada poço. A proliferação celular é representada pelo valor das médias de cpm de cada triplicata de estímulo. **A:** Representa a proliferação promovida por T-STIM em células CTLL-2.; **B:** Representa a razão entre a proliferação induzida por T-STIM e o meio, denominada índice de proliferação; **C:** Re-

presenta a proliferação induzida por rca-IL-15 em células CTLL-2; **D**: Representa a razão entre a proliferação induzida por rca-IL-15 e o meio.

5.3. Avaliação da capacidade de rca-IL-7 e rca-IL-15 de induzir proliferação de CMNSP pré-ativadas pelo tratamento com PHA E IL-2

Previamente, alguns autores mostraram que células T ativadas, obtidas pela estimulação com um mitógeno (Con A ou PHA em combinação ou não com IL-2), proliferam quando cultivadas na por cerca de 72 horas na presença de IL-7 ou IL-15 (GATELY *et al.*, 1991; GRABSTEIN *et al.*, 1994; GIRI *et al.*, 1994). Com o objetivo de avaliar a capacidade de rca-IL-7 e rca-IL-15 de induzir proliferação células T ativadas de cão, linfoblastos de oitos cães saudáveis, gerados pelo cultivo de CMNSP por três dias com 100 µg/mL de PHA e mais 24 horas com IL-2, foram incubados por 72h com diferentes concentrações de rca-IL-7 ou rca-IL-15 do cão e a incorporação de timidina[H]³⁺ foi determinada.

Os valores da mediana e percentil 25 e 75 (em parêntesis) de cpm correspondentes à incorporação de timidina[H]³⁺ para linfoblastos cultivados apenas com meio de cultura (controle negativo), que representam os níveis basais de proliferação, foram de 10611 (6013 e 13371). Já os valores de cpm para linfoblastos cultivados com 10 ng/mL e 20 ng/mL de rca-IL-7 foram 10181 (6915 e 13963) e 12763 (8547 e 17946), respectivamente (Figura 3A e 3B). Comparando os resultados através do teste estatístico de Friedman, que leva em consideração medidas repetidas, e o pós-teste de Dunns, somente o valor de mediana de linfoblastos estimulados com a dose maior de rca-IL-7 (20 ng/ml) é significativamente maior (20 %) do que a mediana do controle negativo (Friedman p=0,008 e Dunns p<0,05). Interessantemente, os valores de cpm obtidos para linfoblastos incubados com 15,6 ng/mL, 62,5 ng/mL e 250 ng/mL de rca-IL-15 foram 15104 (8088 e 19608), 21133 (11859 e 28794) e 27135 (18796 e 34157) (Figura 3C e 3D), sendo as medianas 42 %, 99 % e 156 % maiores que a mediana do controle negativo, respectivamente. A comparação estatística revelou que somente as medianas para linfoblastos estimulados com 62,5 ng/mL e 250 ng/mL de rca-IL-15 são significativamente maiores do que a mediana do controle negativo (Friedman p<0,0001, Dunns p<0,05: controle negativo vs 62,5 ng/mL e Dunns p<0,001: controle negativo vs. 250 ng/mL).

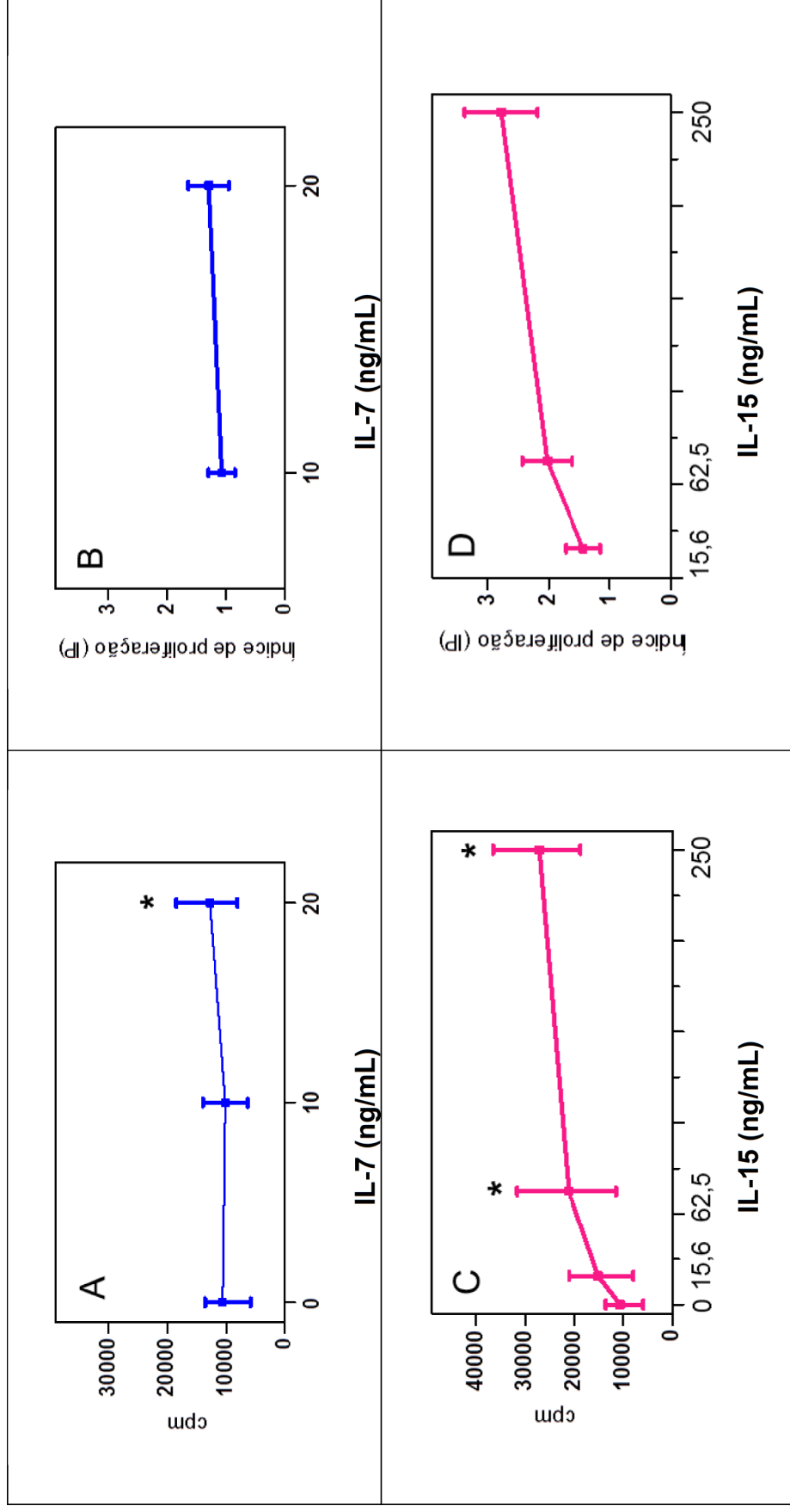


Figura 3. Atividade proliferativa de rca-IL-7 e rca-IL-15 sobre linfoblastos. CMNSP foram obtidas de oito cães saudáveis, pré-estimuladas com 100 µg/mL de PHA e IL-2 e cultivadas na presença de rca-IL-7 e rca-IL-15. A proliferação celular é representada pelos valores da mediana e percentil 25 e 75 de cpm obtidas dos oito animais. **A:** Representa a proliferação induzida pelas doses de rca-IL-7 (10 e 20 ng/mL) e a proliferação basal determinada pelo meio de cultura; **B:** Representa a razão entre a proliferação induzida por rca-IL-7 e o meio; **C:** Representa a proliferação induzida por rca-IL-15 (15,6,

62,5 e 250 ng/mL) e a proliferação basal determinada pelo meio de cultura; **D**: Representa a razão entre a proliferação induzida por rca-IL-15 e o meio.

5.4. Avaliação da capacidade de rca-IL-7 ou rca-IL-15 de induzir proliferação de CMNSP sem estimulação adicional prévia ou concomitante

TREIBER-HELD e colaboradores (1996) relataram que CMNP de seres humanos sadios proliferam quando cultivadas *in vitro* na presença de rIL-7 ou rIL-15 sem a estimulação adicional prévia ou concomitante por mitógeno. Visando determinar se rca-IL-7 e rca-IL-15 também são capazes de induzir proliferação de linfócitos em estado de descanso, CMNSP provenientes de sete cães sadios foram cultivadas na presença de rca-IL-7, nas concentrações de 10 ng/mL e 20 ng/mL, ou de rca-IL-15, nas concentrações de 15,6 ng/mL, 62,5 ng/mL e 250 ng/mL, por 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias. Nas últimas 18 horas do cultivo, foi acrescentada timidina[H]³⁺ e a incorporação desse nucleotídeo radiativo ao DNA das células foi determinada pela contagem de cintilação por minuto (cpm). Os resultados foram expressos como medianas de cpm mais percentil 75 % e menos percentil 25 %, além de índices de proliferação.

Os valores de mediana de cpm mais ou menos percentil 25 e 75, além de índice de proliferação foram mostrados graficamente na Figura 4. Para avaliação do nível basal de proliferação, CMNSP foram cultivadas somente em meio de cultura (controle negativo). Os valores da mediana de cpm encontrados foram relativamente baixos no quarto dia, aumentaram progressivamente alcançando o máximo no oitavo dia e, depois, declinaram até o 14º dia do ensaio. Esses dados sugerem que ocorreu uma proliferação basal com pico no oitavo dia do ensaio. Os valores de cpm obtidos para CMNSP cultivadas na presença de rca-IL-7 na concentração de 10 ng/mL ou 20 ng/mL também foram relativamente baixo no quarto dia, chegaram ao pico no oitavo dia e, a partir daí, decresceram até o 14º do ensaio (Figura 4A e 4B). A comparação estatística revelou diferenças significantes somente entre as medianas de cpm das células cultivadas com 20 ng/mL rca-IL-7 e meio de cultura sem estímulos adicionais nos dias 8 (16.676 vs. 4.415, teste de Friedman: $p=0,0036$ e teste de Dunns: $p<0,01$), 10 (10.213 vs. 3.342, $p<0,0001$ e $p<0,0001$) e 12 dias (6.099 vs 1.606, $p= 0,0003$ e $p<0,01$) do ensaio. Os valores de mediana de cpm das células cultivadas na presença de rca-

IL-15 nas concentrações de 15,6 ng/mL, 62,5 ng/mL e 250 ng/mL exibiram o mesmo padrão apresentado pelas CMNSP cultivadas com ambas as concentrações utilizadas de rca-IL-7 (Figura 4C e 4D). Contudo, os valores de mediana das CMNSP cultivadas com IL-15 foram quase sempre mais elevados, chegando a ser 1,5 a 2 vezes maior no pico, aqueles observados em CMNSP cultivadas com 20 ng/mL de IL-7, maior concentração utilizada nesses experimentos. Ao se comparar as medianas das CMNSP mantidas somente com meio de cultura e aquelas adicionadas de rca-IL-15, observou diferença estatística significativa na concentração de 15,6 ng/mL do quarto ao 14º dia (teste de Friedman: $p < 0,02$ e teste de Dunns: $p < 0,05$), somente no oitavo e no 12º dia ($p < 0,05$) na concentração de 62,5ng/mL e do oitavo ao 14º dia quando se adicionou 250 ng/mL.

Tomando os dados em conjunto, rca-IL-7 (20 ng/mL) e rca-IL-15 (15,6 ng/mL, 62,5 ng/mL ou 250 ng/mL) são capazes de promover a proliferação de CMNSP de cães, acima da proliferação basal, na ausência de estimulação previa adicional ou concomitante (células em estado de descanso). A partir de agora, seria interessante identificar 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 dessas citocinas.

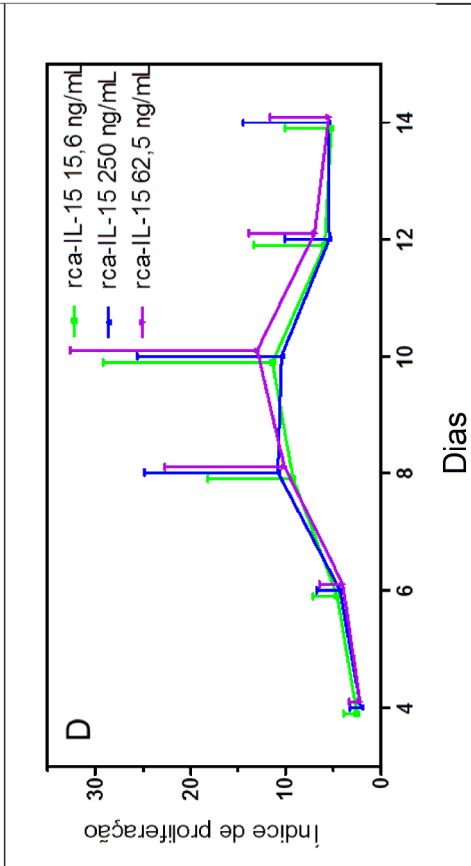
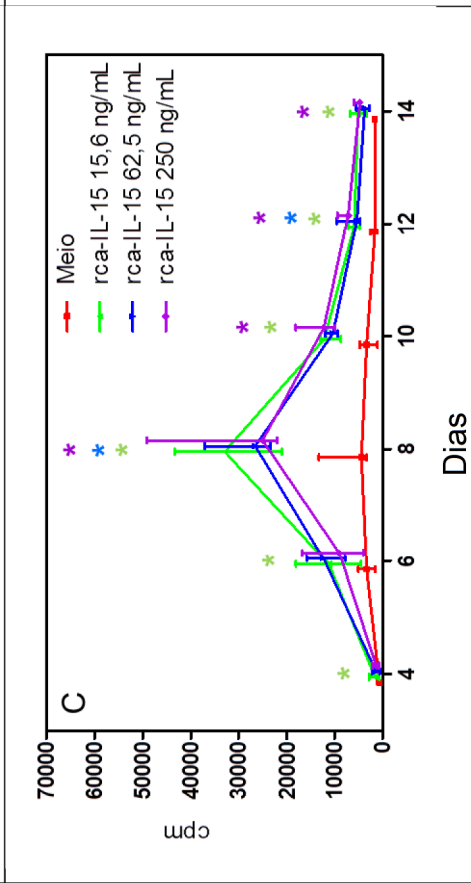
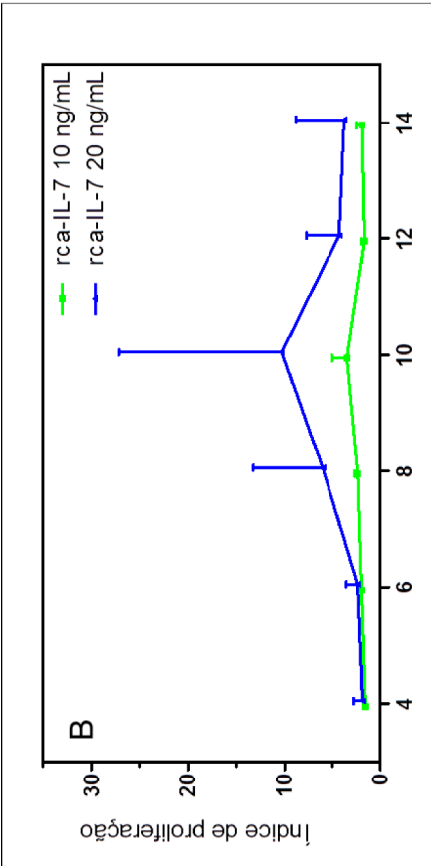
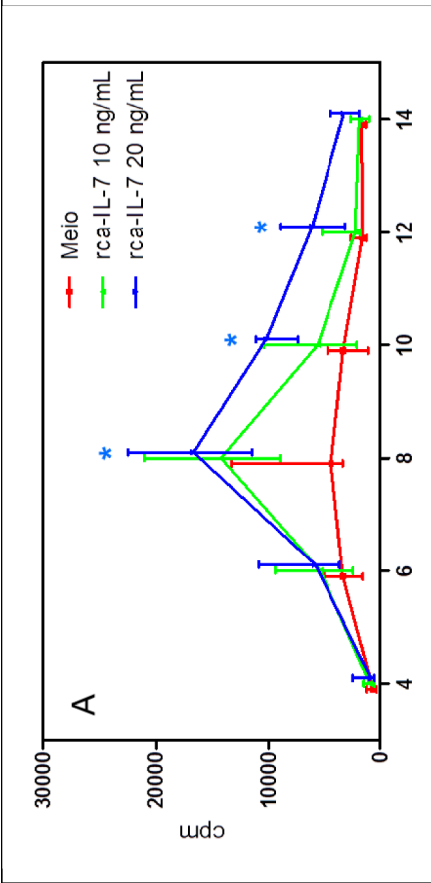


Figura 4. Atividade proliferativa de rcaIL-7 e rcaIL-15 sobre CMNSP sem estimulação adicional prévia ou concomitante. CMNSP foram obtidas de sete cães saudáveis, estimuladas a proliferar durante 14 dias na presença das citocinas e pulsadas com timidina [H]³⁺ durante as últimas 18 horas do 4º, 6º, 8º, 10º, 12º e 14º dias de cultura. A proliferação celular é representada pelos valores da mediana e percentil 25 e 75 de cpm obtidas dos sete cães. **A:** Representa a proliferação induzida pelas doses de rcaIL-7 (10 e 20 ng/mL) e a proliferação basal determinada pelo meio de cultura nos diferentes dias de cultivo; **B:** Representa a razão entre a proliferação induzida por rca-IL-7 e o meio; **C:** Representa a proliferação induzida por rcaIL-15 (15,6, 62,5 e 250 ng/mL) e a proliferação basal determinada pelo meio de cultura nos diferentes dias de cultivo; **D:** Representa a razão entre a proliferação induzida por rca-IL-15 e o meio.

6. DISCUSSÃO

Imunoterápicos são definidos como agentes medicinais para prevenção e/ou tratamento de doenças através da indução, aumento ou supressão da resposta imune em pacientes. Esses agentes abrangem uma infinidade de produtos biológicos, incluindo vacinas, citocinas, imunotoxinas, e anticorpos monoclonais, utilizados no tratamento de doenças infecciosas, neoplásicas, bem como em doenças inflamatórias e autoimunes (HUANG *et al.*, 2010).

Visando a modulação do sistema imune de cão, em nosso laboratório, o cDNA de várias citocinas caninas foi clonado no plasmídeo pcR2.1, incluindo o cDNA de IL-7 e IL-15. No presente trabalho, foi realizada a subclonagem do segmento do cDNA de IL-7 e IL-15 canina, que codifica a proteína madura, em um plasmídeo para expressão da proteína recombinante em *E. coli* (pRSET, Invitrogen). Além disso, foi realizada a produção de IL-7 e IL-15, bem como determinadas algumas atividades biológicas dessas citocinas.

A purificação das proteínas foi realizada em coluna de afinidade e a análise da atividade biológica de IL-15 foi determinada pela indução da proliferação de células CTLL-2. Além disso, foram realizados ensaios *in vitro* com o objetivo de avaliar a capacidade de rca-IL-7 e rca-IL-15 em promover a proliferação de CMNSP de cães pré-ativadas ou não por PHA.

As construções plasmídeais pRSET-call-7 e pRSET-call-15 foram usadas para a produção das proteínas recombinantes em *E. coli* BL21(DE3)pLysS, sob a forma de corpúsculo de inclusão. Geralmente, proteínas produzidas em *E. coli* na forma de corpúsculos de inclusão, que corresponde a agregados enriquecidos da proteína recombinante desnaturada, são isoladas facilmente e em grande quantidade. Isso ocorre, uma vez que nos corpúsculos a proteína-alvo fica protegida da degradação por proteases (RUDOLPH & LILIE, 1996).

Tanto rca-IL-7 quanto rca-IL-15 foram purificadas por cromatografia de afinidade, usando-se colunas com Sepharose-niquel para capturar a cauda de histidina acrescentada às proteínas pelo plasmídeo pRSET, sendo possível obtê-las com grau de pureza acima de 80%. Curiosamente, quando amostras de rca-IL-

15 foram analisadas por SDS-PAGE, mesmo submetendo-se as amostras ao tratamento com 2-mercaptoetanol e aquecimento a 100°C, duas bandas principais de proteína foram observadas, sendo uma de 17kDa e maior intensidade, com monômero de rca-IL-15, e a outra com 21kDa e menor intensidade. Interessantemente, as duas bandas resultantes da purificação de rca-IL-15 foram detectadas por anticorpo anti-histidina, em ensaio de *Western Blot* (dados não mostrados), sugerindo que a banda de maior peso molecular represente um agregado proteico covalente formado por monômero ou fragmento de rca-IL-15 ligados entre si ou monômero ou fragmento de rca-IL-15 ligado a alguma proteína da *E. coli*. Embora existam algumas vantagens em se obter a proteína recombinante na forma de corpúsculo de inclusão, infelizmente, com uma frequência moderada, a proteína pode participar de agregados (BONDOS & BICKNELL, 2003) e representar um problema para purificação. Em experimentos futuros, uma segunda etapa cromatográfica será realizada visando à obtenção de IL-15 com um maior grau de pureza, para isso, serão utilizadas colunas de troca iônica ou de separação por peso molecular.

Uma linhagem de células T CD8 citotóxicas murinas, CTLL-2 (GILLIS *et al.*, 1978), foi usada com o objetivo de avaliar a atividade biológica de IL-15 canina purificada. Essa linhagem celular é amplamente utilizada na literatura em ensaios de avaliação da atividade biológica de IL-15 recombinante de outras espécies (GRABSTEIN *et al.*, 1994; DEAN *et al.*, 2005; XIONG *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2009). A capacidade de rca-IL-15 de induzir proliferação de células CTLL-2 foi avaliada usando-se diluições quádruplas da citocina entre 0,9 ng/mL a 1000 ng/mL, nessa faixa de concentração de rca-IL-15 observou-se uma curva dose dependente entre 0,9 ng/mL e 250 ng/mL. O mesmo efeito dose dependente foi demonstrado por outros autores que clonaram IL-15 de espécies como, gato coelho e símio (GRABSTEIN *et al.*, 1994; DEAN *et al.*, 2005; XIONG *et al.*, 2005).

Não foi possível realizar um ensaio para avaliar a atividade biológica de rca-IL-7 com células de linhagem (ATCC, TIB-239), uma vez que no processo de descongelamento da única alíquota de células disponível, houve contaminação

bacteriana da mesma. Sendo assim, a IL-7 foi testada em caráter mais preliminar que IL-15, diretamente em células de cães.

O próximo passo desse trabalho consistiu em realizar ensaios de linfoproliferação em células de cão que permitirão, futuramente, avaliar o papel de rca-IL-7 e rca-IL15 na modulação da resposta imune em cães. Quando CMNSP de oito cães, pré-estimuladas com PHA e IL-2, foram cultivadas na presença das citocinas caninas foi possível observar que apenas as doses de 20 ng/mL de rca-IL-7 e 62,5 ng/mL e 250 ng/mL de rca-IL-15 apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle (proliferação basal). Os resultados mostrados no presente trabalho estão de acordo com relatos de alguns autores, que mostraram a capacidade dessas citocinas em promover a proliferação celular quando na presença de outros fatores de sinalização ou co-estimulação. GRABSTEIN e colaboradores (1990) relataram que IL-7 é capaz de estimular a proliferação de células T esplênicas murinas, quando ativadas previamente por Con A. BARCHAM e colaboradores (1995) mostraram que IL-7 recombinante de ovino induz proliferação de timócitos ovinos na presença ou ausência de mitógeno. GRABSTEIN e colaboradores (1994) relataram que IL-15 recombinante de símio promove a proliferação de CMNSP humanas ativadas por PHA.

Em um segundo ensaio para a avaliação da atividade biológica rca-IL-7 ou rca-IL-15, foi avaliada a capacidade dessas citocinas de promover proliferação de CMNSP de cães saudáveis, sem estímulo prévio ou concomitante. Caso rca-IL-7 e/ou rca-IL-15 fosse(m) capaz (es) de promover tal estimulação, essa citocinas poderiam ser utilizadas em um método imunoterápico sem a necessidade de algum estímulo adicional. Com os experimentos realizados, observou-se que ambas as citocinas são capazes de induzir a proliferação de CMNSP de cães saudáveis, sendo que a proliferação começa a ser detectada em baixa intensidade a partir do 4º dia, com a maior intensidade no 8º dia, e em declínio nos dias subsequentes. A atividade proliferativa da IL-7 e IL-15 tem sido demonstrado por estudos *in vivo* (SCHLUNS *et al.*, 2000; TAN *et al.*, 2001), no entanto, nessa condição, essa atividade não pode ser atribuída exclusivamente à citocina, dada a

complexidade do ambiente *in vivo*. Com base nesses resultados, podemos afirmar que rca-IL7 e rca-IL15 são capazes de estimular a proliferação de CMNSP de cães, independente de outras variáveis que poderiam afetar o crescimento celular. Resultados semelhantes aos descritos no presente trabalho, foram relatados por TREIBER-HELD e colaboradores (1996) utilizando CMNSP humanas. Nesse estudo, a proliferação celular induzida por IL-7 e IL-15 foi avaliada do 1º ao 19º dia de cultivo. Usando-se concentração de 100 ng/mL IL-7 e de IL-15, os autores detectaram proliferação celular entre o terceiro e o décimo nono, sendo que o pico de proliferação foi detectado no décimo dia. Curiosamente, esses autores também observaram uma pequena proliferação das células, quando as mesmas foram cultivadas apenas na presença de meio de cultura. Eles atribuem esse fato ao aumento da renovação celular que ocorre em virtude da atividade macrófaga em fagocitar debris celulares oriundos da morte de linfócitos.

Os resultados descritos no presente trabalho encorajam a avaliação de ambas as citocinas em estudos que visem o estabelecimento de uma resposta de longa duração em cães com LVC submetidos à quimioterapia convencional.

REIS e colaboradores (2005) descreveram um método baseado em citometria de fluxo apropriado para a determinação de várias subpopulações celulares em células de sangue periférico do cão, incluindo células T CD4+ e TCD8+ *naïve* (CD45RA) e de memória (CD45RB). Em um futuro breve, experimentos serão realizados nos quais CMNSP cultivadas na presença de rca-IL-7 ou rca-IL-15, e mais tarde, CMNSP de cães submetidos as administração rca-IL-7 ou rca-IL-15 serão avaliadas para a determinação das subpopulações de linfócitos estimuladas a proliferar pelo uso das citocinas.

7. CONCLUSÕES

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

1. IL-7 e IL-15 recombinantes caninas, obtidas da purificação do sedimento de *E. coli* apresentam atividade biológica.
2. IL-7 e IL-15 recombinantes caninas são capazes de promover efeito proliferativo em CMNSP de cães saudáveis, pré-ativadas.
3. IL-7 e IL-15 recombinantes caninas são capazes de promover efeito proliferativo em CMNSP de cães saudáveis, sem estimulação prévia ou concomitante.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS A. K; LICHTMAN A. H; PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier. 6ª edição. 2008.
- AKIRA S. [Innate immunity and adjuvants](#). **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 12;366(1579): 2748-2755. 2011
- ALPDOGAN O. & van DEN BRINK M. R. [IL-7 and IL-15: therapeutic cytokines for immunodeficiency](#). **Trends Immunol.** 26(1): 56-64. 2005.
- [ALPDOGAN. O.](#); [MURIGLAN S. J.](#); [ENG J. M.](#); [WILLIS L.M.](#); [GREENBERG A.S.](#); [KAPPEL B.J.](#); [van DEN BRINK M.R.](#) Interleukin-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **J. Clin. Invest.** 112(7): 1095-1107. 2003.
- ARMITAGE R. J.; MACDUFF B. M.; EISENMAN J.; PAXTON R.; GRABSTEIN K. H. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. **J. Immunol.** 154(2): 483-490. 1995.
- ARMITAGE R. J.; NAMEN A. E.; SASSENFELD H. M.; GRABSTEIN K. H. Regulation of human T cell proliferation by IL-7. **J Immunol.** 144(3): 938-941. 1990.
- BAMFORD R. N.; BATTIATA A. P.; BURTON J. D.; SHARMA H.; WALDMANN T. A. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 93(7): 2897-2902. 1996.
- BANETH G. & SHAW S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.** 106(4): 315-324. 2002.
- BARHAM G. J.; ANDREWS A. E.; NASH A. D. [Cloning and expression of a cDNA encoding ovine interleukin 7](#). **Gene.** 154(2): 265-269. 1995.
- BONDOS S. E. & BICKNELL A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. **Anal Biochem.** 15;316(2): 223-231. 2003.
- BOUCHARD A.; RATTHE C.; GIRARD D. Interleukin-15 delays human neutrophils apoptosis by intracellular events and not via extracellular

factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. **J. Leukoc. Biol.** 75(5): 893-900. 2004.

BOYMAN O; PURTON J. F.; SURH C. D.; SPRENT J. [Cytokines and T-cell homeostasis](#). **Curr. Opin. Immunol.** 19(3): 320-326. 2007.

BRADLEY L. M.; HAYNES L.; SWAIN S. L. IL-7: maintaining T-cell memory and achieving homeostasis. **Trends Immunol.** 26(3): 172-176. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. 120p.

BUDAGIAN V.; BULANOVA E.; PAUS R.; BULFONE-PAUS S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. **Cytokine Growth Factor Rev.** 17(4): 259-280. 2006.

BULFONE-PAUS S.; UNGUREANU D., POHL T.; LINDNER G.; PAUS R., RUCKERT R.; KRAUSE H.; RUNZENDORF U. Interleukin-15 protects from lethal apoptosis *in vivo*. **Nat. Med.** 3(10): 1124-1128. 1997.

[BURTON J. D.](#); [BAMFORD R. N.](#); [PETERS C.](#); [GRANT A. J.](#); [KURYS G.](#); [GOLDMAN C. K.](#), [BRENNAN J.](#); [ROESSLER E.](#); [WALDMANN T. A.](#) A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 91(11): 4935-4939. 1994.

[CALAROTA S. A.](#); [DAI A.](#); [TROCIO J. N.](#); [WEINER D. B.](#); [LORI F.](#); [LISZIEWICZ J.](#) IL-15 as memory T-cell adjuvant for topical HIV-1 DermaVir vaccine. **Vaccine.** 26(40): 5188-5195. 2008.

CARROLL H.P.; PAUNOVIC V.; GADINA M. Signalling, inflammation and arthritis: Crossed signals: the role of interleukin-15 and -18 in autoimmunity. **Rheumatology (Oxford).** 47(9): 1269-1277. 2008.

CASSATELLA M. A. & McDONALD P. P. Interleukin-15 and its impact on neutrophil function. **Curr. Opin. Hematol.** 7(3): 174-177. 2000.

[CERRUTI-SOLA S.](#), [KRISTENSEN F.](#), [VANDEVELDE M.](#), [DE WECK AL.](#) Interleukin 1- and 2-like activities in the dog. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 6(3-4): 261-271. 1984

CHAPOVAL A. I.; FULLER J. A.; KREMLEV S. G.; KAMDAR S. J.; EVANS R. Combination chemotherapy and IL-15 administration induce permanent

- tumor regression in a mouse lung tumor model: NK and T cell-mediated effects ANTAGONIZED BY B CELLS. **J. Immunol.**161(12): 6977-6984. 1998.
- CLEM A. S. [Fundamentals of vaccine immunology](#). **J. Glob. Infect. Dis.** 3(1): 73-78. 2011.
- 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.** 182(9): 5702-5711. 2009.
- CONLON P.J.; MORRISSEY P. J.; NORDAN R. P.; GRABSTEIN K. H.; PRICKETT K. S.; REED S. G.; GOODWIN R.; COSMAN D.; NAMEN A. E. Murine thymocytes proliferate in direct response to interleukin-7. **Blood.** 74(4): 1368-1373. 1989.
- COOK G. C. Leishmaniasis: some recent developments in chemotherapy. **J. Antimicrob. Chemother.** 31(3): 327-330. 1993.
- CORREA ANTONIALLI S. A.; TORRES T. G.; PARANHOS FILHO A. C.; TOLEZANO J. E. Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. **J. Infect.** 54:509-514. 2007.
- COSMAN D.; KUMAKI S.; AHDIEH M.; EISENMAN J.; GRABSTEIN K. H.; PAXTON R.; DUBOSE R.; FRIEND D.; PARK L. S.; ANDERSON D. Interleukin 15 and its receptor. **Ciba Found Symp.** 195: 221-229; discussion 229-233. 1995.
- COSTA C. H.; PEREIRA H. F.; ARAÚJO M. V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980- 1986. **Rev. Saude Publica** 24(5): 361-72. 1990.
- COURTENAY O.; QUINNELL R. J.; GARCEZ L. M.; SHAW J. J.; DYE C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.** 186(9): 1314-1320. 2002.
- [DARDALHON V.](#); [JALECO S.](#); [KINET S.](#); [HERPERS B.](#); [STEINBERG M.](#); [FERRAND C.](#); [FROGER D.](#); [LEVEAU C.](#); [TIBERGHIE P.](#); [CHARNEAU P.](#); [NORAZ N.](#); [TAYLOR N.](#) IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4⁺ T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 98(16): 9277-9282. 2001.

- [DEAN G. A.](#); [BARGER A.](#); [LAVOY A.](#) Cloning and expression of feline interleukin 15. **Cytokine**. 29(2): 77-83. 2005.
- DEANE L. M. & DEANE M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. **O Hospital**. 48: 61-76. 1955.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**. 27(5): 305-318. 2004.
- DESJEUX P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol**. 14(5): 417-423. 1996.
- DESJEUX P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc. Trop. Med. Hyg**. 95(3): 239-43. 2001.
- DUTTON R. W; BRADLEY L. M; SWAIN S. L. T cell memory. **Annu. Rev. Immunol**. 16: 201-223. 1998.
- DYE C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 55(2): 125-130. 1996.
- FEHNIGER T. A. & CALIGIURI M.A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. **Blood**. 97(1): 14-32. 2001.
- FRY T. J.; CHRISTENSEN B. L.; KOMSCHLIES K. L.; GRESS R. E.; MACKALL C. L. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. **Blood**. 97(6): 1525-1533. 2001.
- FRY T. J.; MONIUSZKO M.; CREEKMORE S.; DONOHUE S. J.; DOUEK D. C.; GIARDINA S.; HECHT T. T.; HILL B. J.; KOMSCHLIES K.; TOMASZEWSKI J.; FRANCHINI G.; MACKALL C. L. IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. **Blood**. 101(6): 2294–2299. 2003.
- [GAGGERO A.](#); [AZZARONE B.](#); [ANDREI C.](#); [MISHAL Z.](#); [MEAZZA R.](#); [ZAPPIA E.](#); [RUBARTELLI A.](#); [FERRINI S.](#) Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms. **Eur. J. Immunol**. 29(4): 1265-1274. 1999..
- GATELY M. K.; DESAI B. B.; WOLITZKY A. G.; QUINN P. M.; DWYER C. M.; PODLASKI F. J.; FAMILLETTI P. C.; SINIGAGLIA F.; CHIZONNITE R.; GUBLER U. Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). **J.**

- Immunol.** 147(3): 874-882. 1991.
- GILLIS S. & WATSON J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line . **J. Exp. Med.** 152(6): 1709-1719. 1980.
- GILLIS S.; FERM M. M.; OU W.; SMITH K. A. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. **J. Immunol.** 120(6): 2027-2032. 1978.
- GIRI J. G.; AHDIEH M.; EISENMAN J.; SHANEBECK K.; GRABSTEIN K.; KUMAKI S.; NAMEN A.; PARK L. S.; COSMAN D.; ANDERSON D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. **Embo. J.** 13(12): 2822-2830. 1994.
- GIRI J. G.; KUMAKI S.; AHDIEH M.; FRIEND D. J.; LOOMIS A.; SHANEBECK K.; DUBOSE R.; COSMAN D.; PARK L. S.; ANDERSON D. M. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. **Embo. J.** 14(15): 3654-3663. 1995.
- GOLUBEV A. Exponentially modified Gaussian (EMG) relevance to distributions related to cell proliferation and differentiation. **J. Theor. Biol.** 262(2): 257-266. 2009
- GRABSTEIN K. H.; EISENMAN J.; SHANEBECK KD.; RAUCH C.; SRINIVASAN S.; FUNG V.; BEERS C.; RICHARDSON J.; SCHOENBORN M. A.; AHDIEH M.; JOHNSON L.; ALDERSON M. R.; WATSON J. D.; ANDERSON D. M.; GIRI J. G. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. **Science.** 264(5161): 965-968. 1994.
- GRABSTEIN K. H.; NAMEN A. E.; SHANEBECK K.; VOICE R. F.; REED S. G.; WIDMER M. B. [Regulation of T cell proliferation by IL-7.](#) **J. Immunol.** 144(8): 3015-3020. 1990.
- HASSAN J. & REEN D. J. Human recent thymic emigrants--identification, expansion, and survival characteristics. **J. Immunol.** 167(4): 1970-1976. 2001.
- HUANG C. J.; LOWE A. J.; BATT C. A. Recombinant immunotherapeutics: current state and perspectives regarding the feasibility and market. **Appl**

Microbiol Biotechnol. 87:401–410. 2010.

JAMES S. L. & NACY C. Effector functions of activated macrophages against parasites. **Curr. Opin. Immunol.** 5(4): 518-524. 1993.

JENSEN B.; S. MOLLER.; M. W. BENTZON. Statistical evaluation of the lymphocyte proliferation assay with non-stimulated cultures. **J Immunol Methods.** 40(3): 259-274. 1981.

JERONIMO S. M.; OLIVEIRA R. M.; MACKAY S.; COSTA R. M.; SWEET J.; NASCIMENTO E. T.; LUZ K. G.; FERNANDES M. Z.; JERNIGAN J.; PEARSON R. D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 88(4): 386-388. 1994.

KAECH [S. M.](#); [HEMBY S.](#); [KERSH E.](#); [AHMED R.](#) Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. **Cell.** 111(6): 837–851. 2002.

KAECH S. M.; TAN J. T.; WHERRY E. J.; KONIECZNY B. T.; SURH C. D.; AHMED R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. **Nat. Immunol.** 4(12): 1191-1198. 2003.

KATSANIS [E.](#); [XU Z.](#); [PANOSKALTSIS-MORTARI A.](#); [WEISDORF D. J.](#); [WIDMER M. B.](#); [BLAZAR B. R.](#) IL-15 administration following syngeneic bone marrow transplantation prolongs survival of lymphoma bearing mice. **Transplantation.** 62(6): 872-875. 1996.

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

[KENNEDY M. K.](#); [GLACCUM M.](#); [BROWN S. N.](#); [BUTZ E. A.](#); [VINEY J. L.](#); [EMBERS M.](#); [MATSUKI N.](#); [CHARRIER K.](#); [SEDGER L.](#); [WILLIS C.R.](#); [BRASEL K.](#); [MORRISSEY P. J.](#); [STOCKING K.](#); [SCHUH J. C.](#); [JOYCE S.](#); [PESCHON J. J.](#) Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. **J. Exp. Med.** 191(5): 771-780. 2000.

[KIEPER W. C.](#); [TAN J. T.](#); [BONDI-BOYD B.](#); [GAPIN L.](#); [SPRENT J.](#); [CEREDIG R.](#); [SURH C. D.](#) Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. **J. Exp. Med.** 195(12): 1533-1539. 2002.

KLIER A.; FARGETTE F.; RIBIER J.; RAPOPORT G. [Cloning and expression](#)

- [of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain berliner 1715.](#)
EMBO. J. 1(7): 791-799. 1982.
- [KOMSCHLIES K. L.](#); [GREGORIO T. A.](#); [GRUYS M. E.](#); [BACK T. C.](#);
[FALTYNEK C. R.](#); [WILTROUT R. H.](#) 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.** 152(12): 5776-5784. 1994.
- [KURYS G.](#); [TAGAYA Y.](#); [BAMFORD R.](#); [HANOVER J. A.](#); [WALDMANN T. A.](#)
The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. **J. Biol. Chem.** 275(39): 30653-30659. 2000.
- LENZ D. C.; KURZ S. K.; LEMMENS E.; SCHOENBERGER S. P.; SPRENT J.; OLDSTONE M. B.; HOMANN D. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4+T cell memory. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 101(25): 9357-9362. 2004.
- LI W. Q.; GUSZCZYNSKI T.; HIXON J. A.; DURUM S. K. Interleukin-7 regulates Bim proapoptotic activity in peripheral T-cell survival. **Mol. Cell. Biol.** 30(3): 590-600. 2010
- [LODOLCE J. P.](#); [BOONE D. L.](#); [CHAI S.](#); [SWAIN R. E.](#); [DASSOPOULOS T.](#);
[TRETTIN S.](#); [MA A.](#) IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. **Immunity** 9(5): 669-676. 1998.
- LOWRY O. H.; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. L.; RANDALL R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275. 1951.
- LUKES J.; MAURICIO I. L.; SCHÖNIAN G.; DUJARDIN J. C.; SOTERIADOU K.; DEDET J. P.; KUHLS K.; TINTAYA K. W.; JIRKŮ M.; CHOCHOLOVÁ E.; HARALAMBOUS C.; PRATLONG F.; OBORNÍK M.; HORÁK A.; AYALA F. J.; MILES M. A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl. Acad. Sci. U S A.** 104(22): 9375-9380. 2007.
- MA A.; KOKA R.; BURKETT P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. **Annu. Rev. Immunol.** 24: 657-679. 2006.
- MAEURER M. J.; TRINDER P.; HOMMEL G.; WALTER W.; FREITAG K.;

- ATKINS D.; STÖRKEL S. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. **Infect. Immun.** 68(5): 2962-2970. 2000.
- MÁRQUEZ C.; TRIGUEROS C.; FERNANDEZ E.; TORIBIO M. L. The development of T-cell and non-T-cell lineages from Cd34(+) human thymic precursors can be traced by the differential expression of Cd44. **J. Exp. Med.** 181(2): 475-483. 1995.
- MARSTON F. A. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in Escherichia coli. **Biochem. J.** 15;240(1): 1-12. 1986.
- MARZOCHI M. C.; MARZOCHI K. B.; CARVALHO R. W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitol Today.** 10(1): 37-40. 1994.
- MAZZUCHELLI R. I.; WARMING S.; LAWRENCE S. M.; ISHII M.; ABSHARI M.; WASHINGTON A. V.; FEIGENBAUM L.; WARNER A. C.; SIMS D. J.; LI W. Q.; HIXON J. A.; GRAY D. H.; RICH B. E.; MORROW M.; ANVER M. R.; CHERRY J.; NAF D.; STERNBERG L. R.; MCVICAR D. W.; FARR A. G.; GERMAIN R. N.; ROGERS K.; JENKINS N. A.; COPELAND N. G.; DURUM S. K. Visualization and identification of IL-7 producing cells in reporter mice. **PLoS One.** 4(11): e7637. 2009.
- MEAZZA R.; AZZARONE B.; ORENZO A. M.; FERRINI S. Role of Common-Gamma Chain Cytokines in NK Cell Development and Function: Perspectives for Immunotherapy. **J. Biomed. Biotechnol.** 2011:861920. 2011.
- MELCHIONDA F.; FRY T. J.; MILLIRON M. J.; MCKIRDY M. A.; TAGAYA Y.; MACKALL C. L. Adjuvant IL-7 or IL-15 overcomes immunodominance and improves survival of the CD8+ memory cell pool. **J. Clin. Invest.** 115(5): 1177-1187. 2005.
- MONIUSZKO M.; FRY T.; TSAI W. P.; MORRE M.; ASSOULINE B.; CORTEZ P.; LEWIS M. G.; CAIRNS S.; MACKALL C.; FRANCHINI G. Recombinant interleukin-7 induces proliferation of naive macaque CD4+ and CD8+ T cells in vivo. **J. Virol.** 78(18): 9740-9744. 2004.
- MORENO J.; ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.** 18(9): 399-405. 2002.
- MORENO J.; NIETO J.; CHAMIZO C.; GONZALEZ F.; BLANCO F.; BARKER D. C.; ALVA J. The immune response and PBMC subsets in canine

visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 71(3-4): 181-195. 1999.

MORRISSEY P. J.; GOODWIN R. G.; NORDAN R. P.; ANDERSON D.; GRABSTEIN K. H.; COSMAN D.; SIMS J.; LUPTON S.; ACRES B.; REED S. G. Recombinant interleukin 7, pre-B cell growth factor, has costimulatory activity on purified mature T cells. **J. Exp. Med.** 169(3): 707-716. 1989.

[MUNGER W.](#); [DEJOY S. Q.](#); [JEYASEELAN R S. R.](#); [TORLEY L. W.](#); [GRABSTEIN K. H.](#); [EISENMANN J.](#); [PAXTON R.](#); [COX T.](#); [WICK M. M.](#); [KERWAR S. S.](#) Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2. **Cell. Immunol.** 165(2): 289-293. 1995.

[NAMEN A. E.](#); [LUPTON S.](#); [HJERRILD K.](#); [WIGNALL J.](#); [MOCHIZUKI D. Y.](#); [SCHMIERER A.](#); [MOSLEY B.](#); [MARCH C. J.](#); [URDAL D.](#); [GILLIS S.](#) Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. **Nature.** 333(6173): 571-573. 1988a.

NAMEN A. E.; SCHMIERER A.E.; MARCH C. J.; OVERELL R. W.; PARK L. S.; URDAL D. L.; MOCHIZUKI D. Y. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. **J. Exp. Med.** 167(3): 988-1002. 1988b.

NANJAPPA S. G.; WALENT J. H.; MORRE M.; SURESH M. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. **J. Clin. Invest.** 118(3): 1027-1039. 2008.

[NAPOLITANO L. A.](#); [GRANT R. M.](#); [DEEKS S. G.](#); [SCHMIDT D.](#); [DE ROSA S. C.](#); [HERZENBERG L. A.](#); [HERNDIER B. G.](#); [ANDERSSON J.](#); [MCCUNE J. M.](#) Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. **Nat. Med.** 7(1): 73-79. 2001.

NAPOLITANO L. A.; STODDART C. A.; HANLEY M. B.; WIEDER E.; MCCUNE J. M. [Effects of IL-7 on early human thymocyte progenitor cells in vitro and in SCID-hu Thy/Liv mice.](#) **J. Immunol.** 171(2):645-654. 2003.

NAUME B.; GATELY M.; ESPEVIK T. A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2-, and IL-7-induced effects on immunomagnetically purified CD56+ NK cells. **J. Immunol.** 148(8): 2429-2436. 1992.

NAUME B.; JOHNSEN A. C.; ESPEVIK T.; SUNDAN A. Gene expression and

- secretion of cytokines and cytokine receptors from highly purified CD56+ natural killer cells stimulated with interleukin-2, interleukin-7 and interleukin-12. **Eur. J. Immunol.** 23(8): 1831-8. 1993.
- OKAZAKI H.; ITO M.; SUDO T.; HATTORI M.; KANO S.; KATSURA Y.; MINATO N. IL-7 promotes thymocyte proliferation and maintains immunocompetent thymocytes bearing alpha beta or gamma delta T-cell receptors in vitro: synergism with IL-2. **J. Immunol.** 143(9): 2917-2922. 1989.
- OKAZAKI H.; ITO M.; SUDO T.; HATTORI M.; KANO S.; KATSURA Y.; MINATO N. IL-7 promotes thymocyte proliferation and maintains immunocompetent thymocytes bearing alpha beta or gamma delta T-cell receptors in vitro: synergism with IL-2. **J. Immunol.** 1;143(9): 2917-2922. 1989.
- OLFERT E. D.; CROSS B. M.; MACWILLIAM A. A. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Canadian Council on Animal Care. 1993.
- OSBORNE L. C. & ABRAHAM N. Regulation of memory T cells by gammac cytokines. **Cytokine.** 50(2): 105-113. 2010.
- PARK C. S.; YOON S. O.; ARMITAGE R. J.; CHOI Y. S. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. **J. Immunol.** 173(11): 6676-6683. 2004.
- 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.** 40(7): 1852-1861. 2010.
- PEREIRA A. M. 2006. 83f. Ativação de células mononucleares caninas por interleucina-2 e interleucina-12 recombinantes homólogas. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Federal da Bahia..
- PINELLI E.; GONZALO R. M.; BOOG C. J.; RUTTEN V. P.; GEBHARD D.; DEL REAL G.; RUITENBERG E. J. Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.** 25(6): 1594-1600. 1995.
- PINELLI E.; KILLICK-KENDRICK R.; WAGENAAR J.; BERNADINA W.; DEL REAL G.; RUITENBERG J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum. **In-**

- fect. Immun.** 62(1): 229-235. 1994.
- [PUEL A.](#); [ZIEGLER S. F.](#); [BUCKLEY R. H.](#); [LEONARD W.J.](#) Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. **Nat. Genet.** 20(4): 394-397. 1998.
- REICHELT P. C. & SCHWARZ. Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents. **Protein. Expr. Purif.** 46(2): 483-488. 2006.
- REIS A. B.; CARNEIRO C. M.; CARVALHO M. G.; TEIXEIRA-CARVALHO A.; GIUNCHETTI R. C.; MAYRINK W.; GENARO O.; CORRÊA-OLIVEIRA R.; MARTINS-FILHO O. A. 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 Immunopathol.** 10;103(3-4): 173-185. 2005.
- RHALEM A.; SAHIBI H.; LASRI S.; JAFFE C. L. Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 71(1): 69-76. 1999.
- ROCHMAN Y.; SPOLSKI R.; LEONARD W. J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. **Nat Rev Immunol.** 9(7): 480-490. 2009.
- RUDOLPH R. & LILIE H. In vitro folding of inclusion body proteins. **FASEB J.** 10(1): 49-56. 1996.
- SAMBROOK J. & RUSSEL D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3^a ed. New York: Cold Spring Harbor. 2000.
- SCHLUNS K. S. & LEFRANÇOIS L. [Cytokine control of memory T-cell development and survival.](#) **Nat. Rev. Immunol.** 3(4): 269-279. 2003.
- [SCHLUNS K. S.](#); [KIEPER W. C.](#); [JAMESON S. C.](#); [LEFRANÇOIS L.](#) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells *in vivo*. **Nat. Immunol.** 1(5): 426-432. 2000.
- [SERETI I.](#); [DUNHAM R. M.](#); [SPRITZLER J.](#); [AGA E.](#); [PROSCHAN M. A.](#); [MEDVIK K.](#); [BATTAGLIA C. A.](#); [LANDAY A. L.](#); [PAHWA S.](#); [FISCHL M. A.](#); [ASMUTH D. M.](#); [TENORIO A. R.](#); [ALTMAN J.D.](#); [FOX L.](#); [MOIR S.](#); [MALASPINA A.](#); [MORRE M.](#); [BUFFET R.](#); [SILVESTRI G.](#); [LEDERMAN M. M.](#) IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection. **Blood.** 113(25):6304-6314. 2009.

SILVA E. S.; GONTIJO C. M.; PACHECO R. S.; FIUZA V. O.; BRAZIL R. P.
Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 96:285-291. 2001.

[SINGH V.](#); [GOWTHAMAN U.](#); [JAIN S.](#); [PARIHAR P.](#); [BANSKAR S.](#); [GUPTA P.](#); [GUPTA U. D.](#); [AGREWALA J. N.](#) Coadministration of interleukins 7 and 15 with bacille Calmette-Guérin mounts enduring T cell memory response against *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.** 202(3): 480-489. 2010.

SLAPPENDEL R. J. & TESKE E. The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. **Vet. Q.** 19(1): 10-13. 1997.

SOLANO-GALLEGO L.; MORELL P.; ARBOIX M.; ALBEROLA J.; FERRER L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J. Clin. Microbiol.** 39(2): 560-563. 2001.

[SPORTÈS C.](#); [HAKIM F. T.](#); [MEMON S. A.](#); [ZHANG H.](#); [CHUA K. S.](#); [BROWN M. R.](#); [FLEISHER T. A.](#); [KRUMLAUF M. C.](#); [BABB R. R.](#); [CHOW C. K.](#); [FRY T. J.](#); [ENGELS J.](#); [BUFFET R.](#); [MORRE M.](#); [AMATO R. J.](#); [VENZON D. J.](#); [KORNGOLD R.](#); [PECORA A.](#); [GRESS R. E.](#); [MACKALL C. L.](#)
Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets **J. Exp. Med.** 205(7): 1701-1714. 2008.

SURH C. D & SPRENT J. Homeostasis of naive and memory T cells. **Immunity.** 19;29(6): 848-862. 2008.

TAKAHASHI K.; HONEYMAN M. C.; HARRISON L. C. Dendritic cells generated from human blood in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-7. **Hum. Immunol** 55(2): 103-116. 1997.

TAN J. T.; DUDL E.; LEROY E.; MURRAY R.; SPRENT J.; WEINBERG K. I.; SURH C. D. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 98(15): 8732-8737. 2001.

TESH R. B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 52(3): 287-292. 1995.

TREIBER-HELD S.; STEWART D. M.; BARRACLOUGH H. A.; KURMAN C. C.; NELSON D. L. Release of sIL-2R alpha from and activation of native human peripheral blood mononuclear cells by recombinant IL-15. **Clin Im-**

- munol Immunopathol.** 80(1): 67-75. 1996.
- VAN LEEUWEN E. M.; SPRENT J.; SURH C. D. Generation and maintenance of memory CD4(+) T cells. **Curr. Opin. Immunol.** 21(2): 167-172. 2009.
- [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.** 26(2):100-109. 1998.
- VEXENAT J. A.; FONSECA DE CASTRO J. A.; CAVALCANTE R.; TAVARES J. P.; DA SILVA M. R. B.; BATISTA W. H.; FURTADO CAMPOS J. H.; HOWARD M. K.; FRAME I.; MCNERNEY R.; WILSON S.; MILES M. A. Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piaui, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 89(2): 131-135
- VON FREEDEN-JEFFRY U.; VIEIRA P.; LUCIAN L. A.; MCNEIL T.; BURDACH S. E.; MURRAY R. [Lymphopenia in interleukin \(IL\)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine.](#) **J. Exp. Med.** 181(4): 1519-1526. 1995.
- WANG X.; LUPARDUS P.; LAPORTE S. L.; GARCIA K. C. Structural biology of shared cytokine receptors. **Annu. Ver. Immunol.** 27: 29- 60. 2009.
- [WARD A.](#); [ANDERSON M.](#); [CRAGGS R.I.](#); [MALTBY J.](#); [GRAHAMES C.](#); [DAVIES R. A.](#); [FINCH D.](#); [PATTISON D.](#); [OAKES H.](#); [MALLINDER P. R.](#) E. coli expression and purification of human and cynomolgus IL-15. **Protein. Expr. Purif.** 68(1):42-48. 2009.
- WATSON J. D.; MORRISSEY P. J.; NAMEN A. E.; CONLON P. J.; WIDMER M. B. Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture. **J. Immunol.** 143(4): 1215-1222. 1989.
- WEBB L. M.; FOXWELL B. M.; FELDMANN M. Putative role for interleukin-7 in the maintenance of the recirculating naive CD4+ T-cell pool. **Immunology.** 98 (3): 400-405. 1999.
- 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.** 164(4): 1961-1970. 2000.
- WELCH P. A.; NAMEN A. E.; GOODWIN R. G.; ARMITAGE R.; COOPER M. D. Human IL-7: a novel T cell growth factor. **J. Immunol.** 143(11): 3562-

3567. 1989.

[WILLERFORD D. M.](#); [CHEN J.](#); [FERRY J. A.](#); [DAVIDSON L.](#); [MA A.](#); [ALT F. W.](#)

Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. **Immunity**. 3(4): 521-530. 1995.

WILLIAMS K. M.; HAKIM F. T.; GRESS R. E. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. **Semin. Immunol.** 19(5): 318-330. 2007.

XIONG C.; HIXSON P. M.; MENDOZA L. H.; SMITH C. W. [Cloning and expression of rabbit interleukin-15](#). **Vet. Immunol. Immunopathol.** 107(1-2): 131-141. 2005.

[ZHANG X.](#); [SUN S.](#); [HWANG I.](#); [TOUGH D. F.](#); [SPRENT J.](#) Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells *in vivo* by IL-15. **Immunity** 8(5): 591-599. 1998.