

# CLONAGEM DE SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE CITOCINAS FELINAS PARA CONSTRUÇÃO DE CURVA PADRÃO PARA PCR EM TEMPO REAL

Elaine Uchima Uehara<sup>(1)</sup>, Sueli Akemi Taniwaki<sup>(1)</sup>, Andreza Soriano  
Figueiredo<sup>(1)</sup>, João Pessoa Araújo Junior<sup>(1)</sup>.

<sup>(1)</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências de Botucatu

UNESP - Campus de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior, S/N

CEP: 18618-970 - Botucatu / SP, Brazil

(14) 3811-6240 ou 3811-6058

## 1. Resumo

A quantificação de citocinas felinas possibilita uma avaliação do sistema imune do animal em diferentes doenças, permite também a identificação de diferentes fatores que alteram sua secreção, e colabora na compreensão da patogênese das enfermidades. Em humanos e camundongos essa mensuração é feita principalmente pelo método de ELISA, mas para os felinos há uma menor disponibilidade de kits específicos para determinadas citocinas, e estes possuem um custo elevado. Assim, uma alternativa é utilizar a reação de PCR em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) para quantificação absoluta dos RNAs mensageiros das citocinas felinas, uma técnica bastante sensível e específica para analisar a expressão desses genes. Com esse intuito, esse trabalho teve como objetivo clonar as sequências gênicas codificantes de citocinas, para construir uma curva padrão para a qPCR.

Assim, foi feita extração de RNA de amostras de sangue total de gatos domésticos, e estes foram tratados com DNase para evitar contaminação por DNA genômico. O cDNA foi sintetizado, e amplificado com os *primers* específicos para cada fragmento codificante de citocina e o GAPDH felino. Cada amplicon purificado foi inserido em um plasmídeo comercial, e introduzido em bactérias *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ . Os clones recombinantes foram sequenciados para confirmar a inserção do fragmento no vetor. As curvas padrão da qPCR foram construídas com cada plasmídeo recombinante numa de 10<sup>6</sup> a 10<sup>1</sup> cópias por reação. O sequenciamento mostrou que todos os clones eram semelhantes àqueles encontrados no *GenBank*. A eficiência das amplificações, baseado no *slope* das curvas padrão foram: 101,3% para GAPDH, 99,1% para IL-1, 83,2% para IL-6, 94,4% para IL-10, 105,5% para IL-12, 83,4% para IFN- $\gamma$  e 83,8% para TNF- $\alpha$ . O valor de  $r^2$  foi de 0,99 em todas as reações. Dessa forma, com a clonagem dos fragmentos codificantes das citocinas felinas foi possível construir curvas padrão com plasmídeos recombinantes, que poderão ser utilizadas na quantificação absoluta das sequências codificantes de tais proteínas pela qPCR.

**Palavras-chave:** Citocinas felinas, clonagem, qPCR.

## 2. Introdução

Citocina é um termo genérico empregado a um grupo de proteínas responsável pela sinalização celular durante o desencadeamento das respostas imunes. Elas modulam a função de outras células ou da própria célula que as produziram, e intercedem em respostas imunes e inflamatórias.

Algumas citocinas se destacam por servir de parâmetro para a avaliação da condição do sistema imune de animais como:

- IL-1: produzida por monócitos e macrófagos é uma citocina mediadora da inflamação. Vyakarman e colaboradores (1990) explicam em um estudo que IL-1 parece agir de maneira sinérgica a TFN, citocina que, segundo o estudo, aumenta a replicação do HIV pela ativação de um fator celular de transcrição, o NF- $\kappa$ B. A partir disso, Lawrence e colaboradores sugerem, em 1995, que este mecanismo esteja presente também na infecção por FIV, um lentivírus que causa, em gatos domésticos, uma doença muito semelhante a que o HIV causa em humanos.
- IL-6: é uma citocina pró-inflamatória, produzida por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células principalmente em resposta a microorganismos. Pode atuar similarmente a um fator de crescimento quando secretada por mielomas possuindo, neste caso, ação autócrina. (Abbas, 2002).
- IL-10: produzida pelos linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th<sub>2</sub>) é uma proteína imunossupressora, capaz de regular funções de células T e macrófagos (Tizard, 2002).
- IL-12: Interleucina heterodimérica, possui duas subunidades ligadas por pontes dissulfeto, a p35 e a p40. A primeira subunidade é produzida por muitas células e é homóloga a outras citocinas heterodiméricas, já a fração p40 é produzida apenas por fagócitos e células dendríticas e é a citocina biologicamente ativa (Abbas, 2002). Esta promove a ativação de células Th1, induzido a secreção de IL-2 e interferon gama (IFN- $\gamma$ ), além de potencializar a secreção de imunoglobulinas pelas células B (Tizard, 2002).

- IFN- $\gamma$ : citocina que protege contra infecções virais, e promove imunidade mediada por células contra microorganismos intracelulares (Abbas, 2002).
- TNF- $\alpha$ : além do papel mencionado anteriormente, essa citocina é responsável pelo recrutamento de neutrófilos e monócitos para locais de infecção, e pela ativação dessas células na tentativa de erradicar microorganismos (Abbas, 2002)

Muitos autores têm utilizado a quantificação de citocinas felinas para avaliar a condição do sistema imune do animal em diferentes patologias como: enteropatias inflamatórias (Nguyen Van, *et al.*, 2006), infecção pelo Vírus da Imunodeficiência felina (FIV) (Lawrence *et al.*, 1995), alergias de pele (Taglinger, *et al.*, 2008), infecção pelo Coronavírus Felino (FCoV) (Gelain, *et al.*, 2006) entre outras. Isso porque tal dado permite a identificação de diferentes fatores que alteram a secreção daquelas, o que colabora na compreensão da patogenia dessas enfermidades, e na proposição de novas estratégias terapêuticas. Essa mensuração também pode se tornar uma informação importante na clínica por auxiliar no prognóstico da doença, e nas medidas que poderão ser tomadas para que haja um retrocesso desta.

A técnica mais utilizada para quantificação de citocinas em humanos é o ELISA. (Bachanova *et al.*, 2010; Milner *et al.*, 2010; Nikolaeva *et al.*, 2008). Entretanto essa técnica é pouco empregada para os felinos devido a uma menor disponibilidade de imunoreagentes, principalmente no Brasil. Assim, uma alternativa é utilizar a reação de PCR em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) para quantificação absoluta dos RNAs mensageiros das citocinas felinas, uma técnica bastante sensível e específica para analisar a expressão gênica. Visto isto, o objetivo deste trabalho foi clonar as sequências

codificantes das citocinas felinas (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12p35, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$ ), para construir as curvas padrão da qPCR.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Amostras**

Amostras de sangue total de três gatos domésticos foram coletadas através de punção da veia jugular, e armazenadas em tubos estéreis contendo anticoagulantes, e mantidas a 8°C até a chegada aos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP Botucatu.

#### **3.2. Extração de RNA e eliminação do DNA genômico**

O RNA foi extraído do sangue total dos felinos com o kit Total RNA Purification Kit (NorgenBiotek Corporation), conforme orientações do fabricante, no entanto na fase inicial de lise foi realizada passagem da amostra em agulha de insulina (26G) para auxiliar na lise celular .

Ao final da extração adicionou-se 10% de RNase out (Invitrogen®) (1U/ $\mu$ L) ao volume total da solução de eluição. A eficiência da extração foi verificada pela quantificação das amostras extraídas no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

A eliminação da contaminação por DNA genômico foi feita pelo tratamento com RQ1RNase-freeDNAse (Promega®). Resumidamente, 2U da enzima foram utilizadas para digerir o DNA genômico de 16 $\mu$ L de amostra extraída durante 1 hora a 37°C, seguida de inativação a 65°C por 10 minutos.

Cada amostra de RNA foi submetida à PCR para detecção do gene gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) felino utilizando os *primers* listados na tabela 1, para verificar a eficiência do tratamento. A reação foi realizada num volume final de 20µL, contendo 1x GoTaq® Green Master Mix (Promega®), 0,4µM de cada *primer* e 2 µL do RNA tratado. A amplificação foi realizada seguindo os seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 45 segundos para separação das fitas, 55°C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, e 72°C por 1 minuto para extensão das fitas. Ao final dos ciclos foi feita uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

As amostras que ainda apresentavam algum produto de amplificação para o GAPDH felino foram consideradas contaminadas por DNA genômico, e um novo tratamento com DNase foi feito.

### 3.3. Síntese de cDNA e amplificação dos fragmentos codificantes de citocinas felinas

O cDNA foi sintetizado com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System utilizando *random primers*, conforme recomendação do fabricante, e armazenado a -20°C até o momento de uso.

Para amplificação do cDNA com os *primers* específicos para cada sequência gênica codificante das citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IFNγ e TNF-α), e do GAPDH felino (Tabela1) foi utilizado 0,4µM de cada *primers* e o kit GoTaq® Green Master Mix - Promega®, seguindo as seguintes etapas: etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação das fitas de DNA, 55°C por 1 minuto para

anelamento dos *primers*, e 72°C por 1 minuto e meio para extensão das fitas.

Uma etapa de 72°C por 5 minutos foi feita para a extensão final do DNA.

**Tabela 1: Descrição dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos das citocinas e do GAPDH:**

<i>Primer</i>	Sequência (5'→3')	Posição	Tamanho	nº acesso***
GAPDH fel S	GCCGTGGAATTTGCCGT	598-614	81*/164**bp	DQ403061
GAPDH fel AS	GCCATCAATGACCCCTTCAT	659-678		
IL6 fel S	CTCCACAAGCGCCTTC	37-22	127bp	D13227
IL6 fel AS	TGCAGAGGTGAGTGGTAGTC	148-129		
IL10 fel S	ACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG	218-239	108bp	AF060520
IL10 fel AS	CGTGCTGTTTGATGTCTGG	325-307		
TNF $\alpha$ fel S	CACATGGCCTGCAACTAATC	194-213	104bp	M92061
TNF $\alpha$ fel AS	AGCTTCGGGGTTTGCTACTAC	297-277		
IL12p35 fel S	AATGTTCCAGTGCCTCAACC	108-127	80bp	Y07761
IL12p35 fel AS	CTAGAGTTTGTCTGGCCTTCTG	187-166		
IL1 $\beta$ fel S	ATTGTGGCTATGGAGAACTGAAG	246-269	101bp	NM001077414
IL1 $\beta$ fel AS	TCTTCTCAAAGATGCAGCAAAAG	346-323		
IFN $\gamma$ fel S	TGCAAGTAATCCAGATGTAGCAG	117-139	81bp	AY878359
IFN $\gamma$ fel AS	GTTTTATCACTCTCCTCTTCCAG	174-197		

Nguyen Van *et al.*, 2006; Taglinger *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2010.

\*fragmento esperado na RT-PCR.

\*\*fragmento esperado na PCR.

\*\*\*[www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)

Após a PCR, os produtos que apresentaram produto do tamanho de interesse foram purificadas com o kit NucleoSpinStract II (Macherey-Nagel®) seguindo o protocolo do fabricante e, quantificadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% em comparação ao Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®).

### 3.4. Clonagem

Foi feita reação de ligação de cada fragmento de cDNA codificante de citocinas e GAPDH felino com o vetor pGEM T Easy(Promega®), utilizando a T<sub>4</sub> DNA Ligase (Promega®), conforme recomendações do fabricante.

A transformação físico-química foi feita em bactérias *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ , com cada plasmídeo recombinante. Estas foram plaqueadas em meio LB ágar (SAMBROOK *et al.*, 1989) contendo 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e, 100  $\mu$ L de IPTG (isopropil 1  $\beta$ -tiogalactopiranosídeo– 100 mmol/L) e 20  $\mu$ L de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosídeo – 50 mg/mL) aplicados na sua superfície. As placas foram incubadas *overnight* a 37°C.

### 3.5. Sequenciamento e extração plasmideal

A presença de plasmídeo recombinante com fragmento desejado foi verificada pela PCR utilizando os *primers* do vetor descritos pelo fabricante (pGEM-TF 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3' posição 2949-2972 e pGEM-TR 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3' posição 176-197).

A amplificação foi realizada com uma etapa inicial de lise das bactérias e desnaturação a 94°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação da fita de DNA, 51°C por 1 minuto para a hibridização dos *primers* e 72°C por 1 minuto para a extensão das fitas, e a fase

de extensão final de 72°C por 10 minutos. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel Stain (Invitrogen<sup>®</sup>).

Os fragmentos amplificados que possuíam tamanho esperado foram purificados com o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System Promega<sup>®</sup>. Esses fragmentos foram submetidos ao sequenciamento para confirmação da sequência e da orientação do fragmento inserido utilizando o BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e o aparelho de sequenciamento automático ABI3500 (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante, e utilizando os *primers sense e antisense* do vetor pGEM.

Os clones que tiveram a inserção confirmada no sequenciamento foram cultivados em caldo LB (SAMBROOK et al., 1989) sob agitação a 220 rpm, a 37°C por 6 a 7 horas e posteriormente armazenadas a -70°C com 10% de glicerol.

Os plasmídeos recombinantes desses clones foram extraídos com o kit NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid (Macherey-Nagel<sup>®</sup>), conforme orientações do fabricante, e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific).

### 3.6. Construção da curva padrão

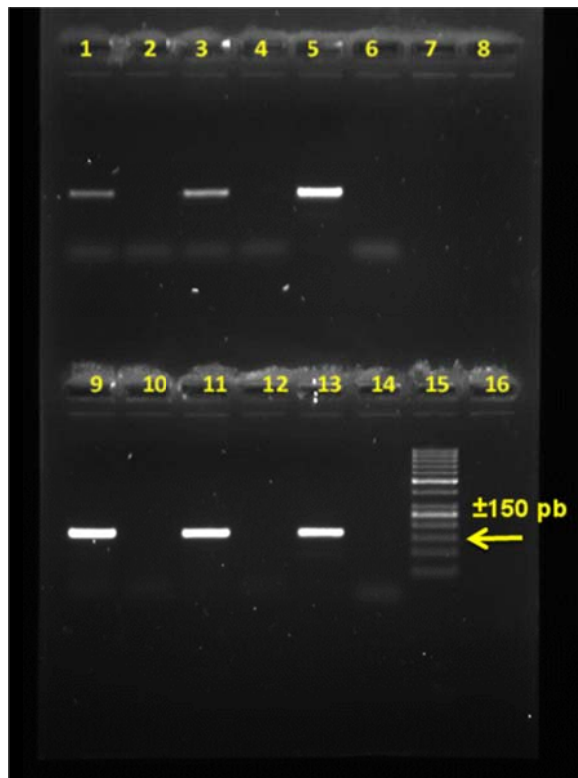
A curva padrão de cada fragmento de citocina felina, assim como de GAPDH, foi construída com o respectivo plasmídeo recombinante numa diluição de 10<sup>6</sup> a 10<sup>1</sup> cópias por reação, em duplicata. A reação foi realizada com 300nM de cada *primer* e o kit Go Taq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega<sup>®</sup>), segundo protocolo do fabricante. A amplificação foi realizada no aparelho 7300

Real Time PCR System (Applied Biosystems), com as seguintes condições: 95°C por 2 minutos para a ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e 60°C por 1 minuto para anelamento e extensão. A especificidade da reação foi confirmada pela análise da curva de dissociação (95°C for 15 s, 60°C for 30 s e 95°C for 15 s).

#### **4. Resultados**

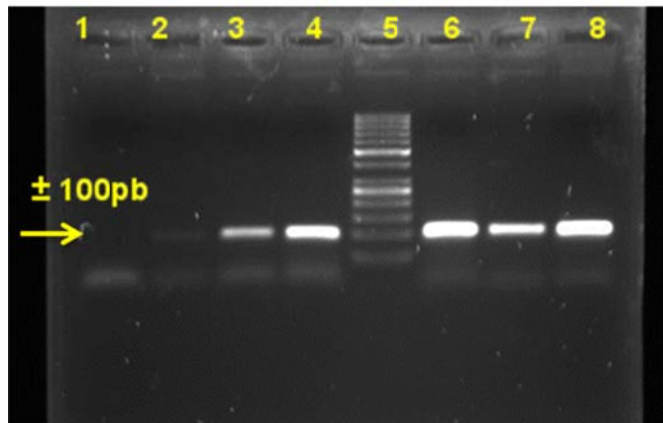
##### **4.1. Amostras, tratamento do RNA e amplificação dos fragmentos**

O tratamento dos RNAs extraídos do sangue total dos gatos foi bastante eficiente, como pode ser observado na figura 1. A ausência de banda de aproximadamente 164 pb, que correspondente à amplificação do DNA para GAPDH felino, nos poços 2, 5, 10 e 12 indica que o DNA genômico foi eficientemente digerido. Já nas colunas 1, 3, 9, e 11, que contém o RNA não tratado, observa-se que ainda há contaminação por DNA genômico.

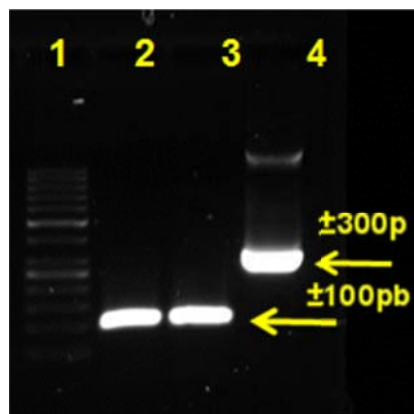


**Figura 1** - PCR dos RNAs com e sem tratamento de DNase para o GAPDH felino. Colunas 1, 3, 9 e 11: RNA não tratado; 2, 4, 10 e 12: RNA tratado com DNase; 5 e 13: DNA usado como controle positivo; 6 e 14: controles negativos; 15: GeneRuler™ 50pb Fermentas®.

Uma única reação de amplificação foi suficiente para a visualização de produtos amplificados de IL-1, IL-10 e GAPDH felino. Como pode-se observar na Figura 2, houve amplificação de um fragmento esperado para IL-1 (aproximadamente 101pb) nos poços 3 e 4, e para IL-10 (aproximadamente 108pb) nos poços 6 e 7. Para as demais citocinas foi necessário realizar uma segunda amplificação, com os mesmos *primers*, e o mesmo ciclo, entretanto utilizando 1µL do produto previamente amplificado. Na figura 3, verifica-se que as amostras 1, 6 e 7 foram positivas, pois amplificaram um fragmento do tamanho esperado para cDNA (81pb para IFN-γ, e 104 para TNF-α).



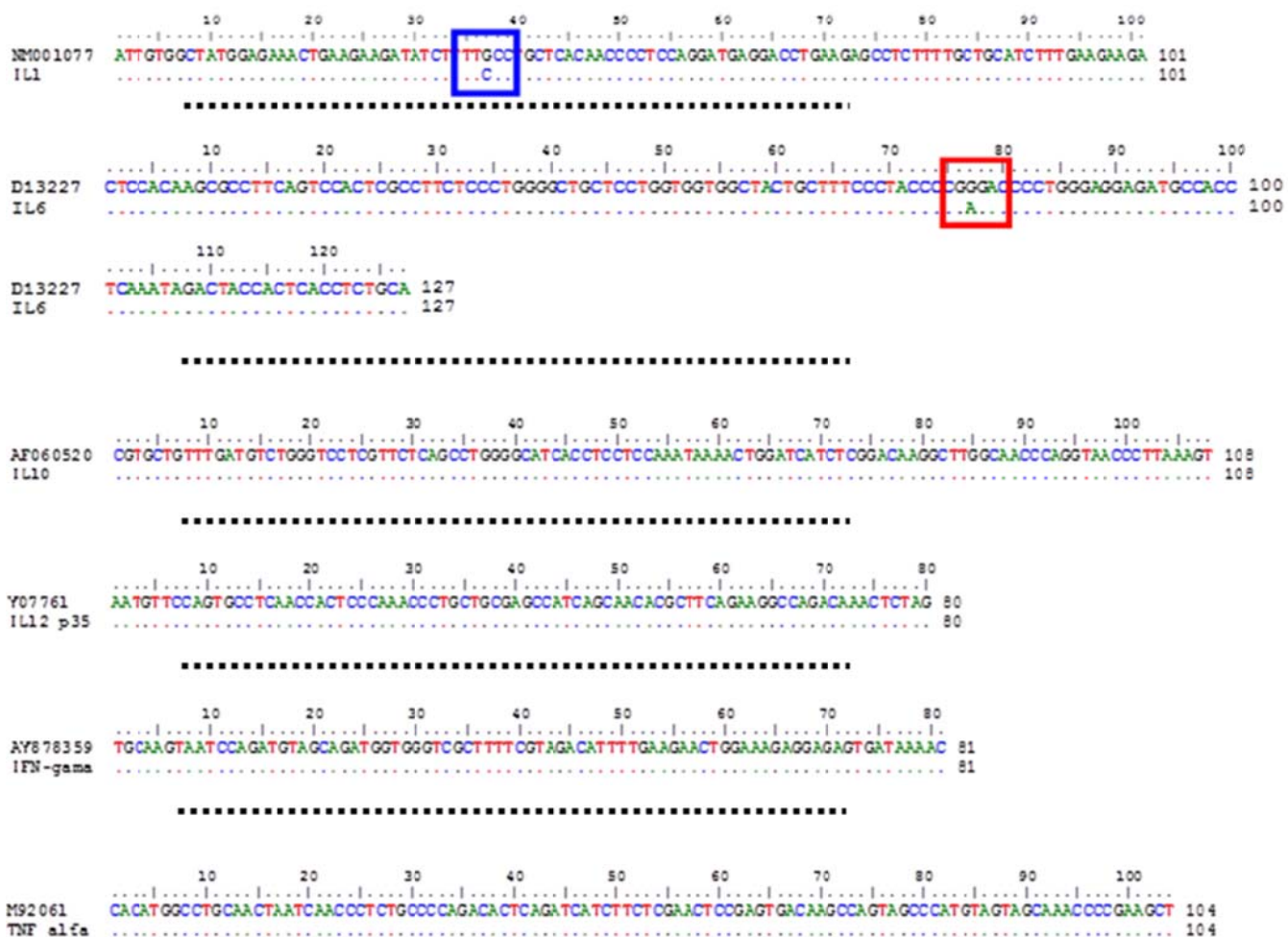
**Figura 2** - PCR dos cDNAs com *primers* específicos para as sequências genéticas codificantes das citocinas IL-1, IL-10. 1: Controle negativo; 2 e 8: Controle positivo; 3 e 4: cDNAs amplificados para IL-1; 6 e 7: cDNAs amplificados para IL-10.



**Figura 3** - PCR dos produtos já amplificados para IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . 1: GeneRuler™ 50pb Fermenta; 2 e 3: cDNAs amplificados para TNF- $\alpha$ ; 4: DNA utilizado como controle positivo.

#### 4.2. Sequenciamento e construção da curva padrão

Todas as sequências foram semelhantes àsquelas encontradas no banco de dados do NCBI, como pode ser visto na figura 3.



**Figura 4** - Comparação das sequências obtidas e encontradas no *GenBank*. Os quadrados em destaque mostram onde não houve identidade entre as bases.

A eficiência das amplificações, baseado no *slope* das curvas padrão foram: 101,3% para GAPDH, 99,1% para IL-1, 83,2% para IL-6, 94,4% para IL-10, 105,5% para IL-12, 83,4% para IFN $\gamma$  e 83,8% para TNF $\alpha$ . O valor de  $r^2$  foi de 0,99 em todas as reações. Todas as reações apresentaram sensibilidade analítica de 10 cópias por reação, e a especificidade da reação foi observada pela presença de pico único na curva de dissociação.

## 5. Discussão

As sequências das citocinas felinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , foram selecionadas para a construção da curva padrão, uma vez que são importantes na avaliação do sistema imune do gato. Trabalhos com as mais diferentes enfermidades têm estudado esses sinalizadores, e tentado relacionar o estado clínico do animal com o perfil de expressão dos mesmos (Nguyen Van, *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 1995; Taglinger, *et al.*, 2008; Gelain, *et al.*, 2006). O fragmento codificante do GAPDH felino também é usado repetidamente como normalizador interno na reação de qPCR (Taglinger, *et al.*, 2008; Gelain, *et al.*, 2006; Nguyen Van, *et al.*, 2006).

A utilização do sangue total como amostra torna-se uma forma mais simples e mais precisa de fazer tal mensuração. Mais simples, pois além de haver uma quantidade menor de intervenções, estas são menos invasivas ao animal do que biópsias de pele (Taglinger, *et al.*, 2008), ou retirada de placenta (Scott, *et al.*, 2010), e mais precisa pois, como relatado por Nguyen Van em 2006, a utilização do sangue interfere menos sobre o efeito dos padrões de expressão de citocinas, fornecendo, assim, informações mais exatas sobre o status periférico imunológico dos animais.

Em relação à amplificação dos cDNAs, como dito anteriormente, para o GAPDH felino, IL-1 e IL-10 foi necessária apenas uma amplificação muito provavelmente porque esses genes são mais expressos pelos felinos.

IL-1 por ser uma citocina relacionada à inflamação, e à imunidade inata (a linha de defesa inicial contra microorganismos) (Abbas, 2002) pode estar sendo expressa mais do que as demais por ser uma das primeiras alternativas à qualquer infecção. Até mesmo em gatos SPF (Specific Pathogen Free), que

por não sofrerem nenhum estímulo não deveriam apresentar qualquer produção de citocinas, apresentam uma expressão detectável na RT-qPCR (Gelain, *et al.*, 2006). Entretanto, TNF- $\alpha$ , que tem uma atividade muito semelhante à da citocina anterior, possui dados muito controversos em relação à sua produção basal. Enquanto esta citocina é muito pouco detectada mesmo em felinos infectados pelo Coronavírus felino (FCoV) (Gelain, *et al.*, 2006), outros estudos detectaram-na em todos os indivíduos com alergias de pele (Taglinger, *et al.*, 2008).

IL-10 também é quantificada em quase todos os gatos saudáveis, e em todos os gatos doentes do trabalho de Taglinger e colaboradores, de 2008. Neste, eles justificam a detecção desta citocina nos dois grupos devido à uma grande gama de células produzirem IL-10 como macrófagos, monócitos, células B e T e queratinócitos. O mesmo pode ter ocorrido no presente trabalho. Devido à uma não diferenciação entre felinos sadios ou não, pode-se afirmar que pela variedade de células produtoras de IL-10, não foi difícil amplificar seus fragmentos.

Já para as demais citocinas foi necessário uma reamplificação dos produtos pois estas, ao contrário das anteriores, deveriam estar sendo menos expressas pelos gatos utilizados no experimento.

IL-6, por exemplo, é uma citocina pró-inflamatória bastante expressa, e por isso facilmente quantificada em animais que sofrem de enteropatias inflamatórias (Nguyen Van, *et al.*, 2006) e alergias de pele (Taglinger, *et al.*, 2008). Tal fator pode indicar que os animais usados no experimento não possuíam qualquer tipo de inflamação, e por isso, não produziam tanta IL-6.

IFN- $\gamma$  é a principal citocina ativadora de células na imunidade adquirida contra microorganismos intracelulares (Abbas, 2002). Por essa razão ela não é quantificada em gatos SPF (Taglinger, *et al.*, 2008), e muito pouco em animais com alguma espécie de inflamação (Taglinger, *et al.*, 2008) (Nguyen Van, *et al.*, 2006), mas sem infecção concomitante. Por esses motivos, essa citocina não deve estar sendo expressa pelos animais usados no experimento.

Através do sequenciamento foi possível perceber que duas citocinas apresentavam algumas bases trocadas: IL-1, e IL-6, e que IL-10 havia sido inserida com o sentido invertido no plasmídeo. As demais possuíam a sequência idêntica àquela encontrada no banco de dados do NCBI.

No fragmento de IL-1 há uma substituição de uma guanina por uma citosina. Outras 3 colônias apresentaram a mesma substituição, portanto pode-se deduzir que o animal utilizado nos experimentos possui um código diferente daquele encontrado no banco de dados.

Já na sequência de IL-6, houve a troca de uma guanina (da sequência obtida no GenBank) por uma adenina (da sequência obtida). Acredita-se que a substituição tenha sido um erro da polimerase durante a amplificação do cDNA, pois em outro clone sequenciado também havia um erro, mas em outra localização.

## **6. Conclusão**

A clonagem de fragmentos codificantes de citocinas felinas permitiu a construção curvas padrão com plasmídeos recombinantes. Estas curvas poderão ser usadas na quantificação absoluta dos fragmentos que codificam citocinas através da qPCR.

## 7. Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier, 2002.

BACHANOVA, V. *et al.* Allogenic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunology Immunotherapy* v.59, n.11, p. 1739-174, 2010.

GELAIN, M.E.; MELI, M.; PALTRINIERI, S. Whole blood cytokine profiles in cats infected by feline coronavirus and healthy non-FCoV infected specific pathogen-free cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.8, p.389-399, 2006.

LAWRENCE, C.E.; CALLANAN, B.J.; WILLETT B.J.; JARRET, O. Cytokine production by cats infected with feline immunodeficiency virus: a longitudinal study. *Immunology*, v.85, p.568-574, 1995.

MILNER, T. ; REILLY, L.; NAUSCH, N.; MIDZI, N.; MDULUZA, T.; MAIZELS, R.; MUTAPI, F. Circulating cytokine levels and antibody responses to human *Schistosoma haematobium*: IL-5 and IL-10 levels depend upon agr and infection status. *Parasite Immunology*, v.37, p. 710-721, 2010.

NGUYEN VAN, N.; TAGLINGER, K.; HELPS, C.R.; TASKER, S.; GRUFFYDD-JONES, T.J.; DAY, M.J. Measurement of cytokine mRNA expression in intestinal biopsies of cats with inflammatory enteropathy using

quantitative real-time RT-PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.113, p. 404-414, 2006.

NIKOLAEVA, L.G.; MAYSTAT, T.V.; PYLYPCHUCK, V.S.; VOLYANSKII, Y.L.; FROLOV, V.M.; KUTSYNA. Cytokine profiles of HIV patients with pulmonary tuberculosis resulting from adjunct immunotherapy with herbal phytoconcentrates Dzherelo and Anemin. *Cytokine*, v.44, n.3, 2008.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. In: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCOTT, V.L.; BOUDREAUX, C.E.; LOCKETT, N.N.; CLAY, B.T.; COATS, K.S. Cytokine dysregulation in early and late placentas from feline immunodeficiency virus (FIV)-infected Cats. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010.

TAGLINGER, K.; NGUYEN, N.V.; HELPS, C.R.; DAY, M.J.; FOSTER, A.P. Quantitative real-time RT-PCR measurement of cytokine mRNA expression in the skin of normal cats and cats with allergic skin disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.122, p.216-230, 2008.

TIZARD, I.R. *Imunologia Veterinária: Uma Introdução*. Tradução Lúcia Jamli Abel. 6.ed. São Paulo. Roca, 2002.

TOMPKINS, M.B.; TOMPKINS, W.A. Lentivirus-induced immune Dysregulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.15, n.123, p.45-55, 2008.

VYAKARNAM, A.; Mc KEATING, J.; MEAGER, A.; BEVERLY, P.C. Tumor necrosis factors ( $\alpha$  e  $\beta$ ) induced by HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells potentiate virus replication. *AIDS*, 4, 21, 1990.