

**Christina Monerat Toledo Machado**

**Desenvolvimento de uma vacina sintética  
contra a Leishmaniose Visceral Canina  
utilizando tecnologia peptídica (Phage  
Display e Spot Síntese)**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Agosto de 2010**

**CHRISTINA MONERAT TOLEDO MACHADO**

**Desenvolvimento de uma vacina sintética  
contra a Leishmaniose Visceral Canina  
utilizando tecnologia peptídica (Phage Display  
e Spot Síntese)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Área de concentração: Biologia Molecular – Parasitologia

Orientador: Prof. Carlos Delfin Chávez Olortegui.  
Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG  
Belo Horizonte  
2010

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Carlos Delfin Chávez Olortegui pelos 10 anos de ótima convivência, orientação e por todo o apoio ao longo desses anos.

Ao Professor Tomaz, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular pela possibilidade de aperfeiçoamento profissional e amadurecimento científico.

Ao Dr. Marco Túlio Ribeiro Gomes. Você foi fundamental para a realização deste trabalho. Muito obrigada por toda a sua ajuda!

Ao Professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara por ter me recebido tão bem em seu laboratório e por toda a orientação fundamental para o desenvolvimento deste projeto.

A todos os amigos (do passado e presente) do Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, principalmente Ricardo, Liza, Clara, Larissa e Ju, que sempre estiveram disponíveis quando precisei.

Aos novos amigos do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, especialmente Pedro Gazzinelli, Jacqueline e Michelle.

À Marina de Moraes Mourão, do Centro de Pesquisas René Rachou, por ter sido sempre tão acessível e gentil.

A toda minha família que sempre me apoiou e incentivou.

Ao Lu, por sempre acreditar em mim e ser meu maior incentivador.

À Lara, meu maior orgulho e principal motivo pelo qual estou aqui hoje.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2- REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
2.1- Agente etiológico e transmissão .....	<b>5</b>
2.2- Vetor .....	<b>5</b>
2.3. Ciclo biológico e morfologia .....	<b>5</b>
2.4- Epidemiologia .....	<b>6</b>
2.5- Patogenia da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) .....	<b>7</b>
2.6- Diagnóstico e controle da LVC .....	<b>9</b>
2.7- Resposta imune na leishmaniose murina .....	<b>11</b>
2.8- Vacinas e Leishmaniose Visceral Canina .....	<b>13</b>
2.9- A técnica de Phage Display: Expressão de peptídeos na superfície de fagos .....	<b>14</b>
2.10- Síntese de peptídeos em membrana de celulose. Método de Spot- Síntese .....	<b>15</b>
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
3.1- Objetivo geral .....	<b>17</b>
3.2- Objetivos específicos .....	<b>17</b>
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1- Amostras de soros .....	<b>18</b>
4.2- Parasitas e extrato solúvel de <i>Leishmania chagasi</i> .....	<b>18</b>
4.3- ELISA dos soros de cães positivos e negativos .....	<b>19</b>

4.4- Extração e purificação de imunoglobulinas anti- <i>L.chagasi</i> e normais para seleção de fagos específicos no biopanning .....	19
4.5- Teste de ELISA para verificação da reatividade das IgGs purificadas .....	20
4.6- Técnica de Phage Display .....	21
4.6.1- Seleção de peptídeos expressos na superfície dos fagos (Biopanning) .....	22
4.6.2- ELISA para testar a reatividade dos fagos nos três ciclos de seleção .....	23
4.6.3- <i>Screening</i> de antígenos selecionados .....	23
4.6.4- Teste de reação cruzada dos clones positivos .....	24
4.6.5- Subclonagem dos clones positivos .....	24
4.7- Seqüenciamento de DNA viral .....	25
4.7.1- Extração do DNA .....	25
4.7.2- Dosagem do DNA .....	25
4.7.3- Sequenciamento automático capilar .....	25
4.8- Identificação e análise de homologia dos peptídeos selecionados .....	25
4.9- Síntese química manual do peptídeo em fase sólida – Método F-moc .....	25
4.10- Purificação do peptídeo sintético .....	27
4.11- Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana .....	27
4.12- Ensaio de infectividade <i>in vitro</i> .....	28
4.13- Preparação de lipossomos para imunização de camundongos .....	29
4.14- Imunizações de camundongos com lipossomos .....	30
4.15- Elisa para verificação de anticorpos após ciclo de imunização .....	31
4.16- Infecção desafio .....	31
4.17- Análise da carga parasitária após infecção desafio .....	31
4.17.1- Extração de DNA do baço .....	31
4.17.2- Real time PCR .....	32
4.18- Análises pós vacinais .....	32

4.18.1- Isolamento e cultura dos esplenócitos .....	32
4.18.2- Dosagem de citocinas .....	33
<b>5- RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
5.1- Teste de ELISA do tipo Indireto para Leishmaniose Canina .....	34
5.2- Reatividade das imunoglobulinas purificadas frente ao antígeno de <i>L.chagasi</i> .....	35
5.3- Reatividade dos fagos após três ciclos de seleção .....	36
5.4- Seleção dos fagos de interesse (Screening) .....	37
5.5- Especificidade dos clones positivos frente a IgGs normais .....	38
5.6- Especificidade dos clones positivos frente a IgGs de cão anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	39
5.7- Purificação do peptídeo .....	41
5.8- Espectrometria de massa .....	42
5.9- Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana .....	42
5.10- Análise de infectividade in vitro .....	43
5.11- ELISA para verificar a reatividade de anticorpos após imunização .....	44
5.12- Análise da carga parasitária .....	45
5.13- Avaliação da produção de citocinas por ELISA .....	46
<b>6- DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7- CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>8- PERSPECTIVAS .....</b>	<b>54</b>
<b>9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>55</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**BCIP-** 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate

**BSA-** Bovine Serum Albumine

**CBS-** Citrate Buffer Sodium

**CO<sup>2</sup>.** Dióxido de Carbono

**Con A-** Conavalina A

**DIPC-** Diisopropilcabodiimida

**DMF-** Dimetilformamida

**DNA-** Ácido Desoxiribonucleico

**ELISA-** Reação de Imunoabsorção por Ligação Enzimática

**Fmoc-** Fluorenil Metil Oxicarbonila

**g-** Grama

**HOBt-** Hidroxibenzotriazol

**HPLC-** High Performance Liquid Chromatography

**H<sup>2</sup>O<sup>2</sup>.** Peróxido de hidrogênio

**ICB-** Instituto de Ciências Biológicas

**IFN- $\gamma$ -** Interferon gama

**IgA-** Imunoglobulina A

**IgG-** Imunoglobulina G

**IgG1-** Imunoglobulina G1

**IgM-** Imunoglobulina M

**IL-2-** Interleucina 2

**IL-12-** Interleucina 12

**IL-4-** Interleucina 4

**IL-5-** Interleucina 5

**IL-6**- Interleucina 6

**IL-10**- Interleucina 10

**IL-12R**- Receptor de Interleucina 12

**iNOS**- óxido nítrico sintase induzível

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**- Fosfato de Potássio Monobásico

**KCl**- Cloreto de potássio

**KDa**- Kilodaltons

**L**- Litro

**LPG**- Lipofosfoglicano

**LT**- Linfócito T

**LV**- Leishmaniose Visceral

**LVC**- Leishmaniose Visceral Canina

**M**- Molar

**Meio LB**- Meio Luria Bertani

**Meio RPMI**-

**mg**- Miligrama

**mg/mL**- Miligrama por mililitro

**MTT**- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

**mL**- Mililitro

**mM**- Milimolar

**N**- Normal

**NO**- Óxido Nítrico

**nm**- Nanômetro

**ng**- Nanograma

**NaCl**- Cloreto de sódio

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**- Difosfato de sódio

**NaHCO<sub>3</sub>**- Carbonato de sódio

**OPD**- o-fenilendiamina

**PBS**- Salina tamponada com fosfato

**PCR**- Reação em Cadeia da Polimerase

**PEG**- Polietilenoglicol

**pH**- Potencial hidrogênionico

**RIFI**- Reação de Imunofluorescência Indireta

**RPM**- Rotações por minuto

**TBS**- Salina Tamponada com Tris

**TFA**- Ácido trifluoracético

**TGF-β** - Fator de transformação do crescimento beta

**Th0**- T auxiliar 0

**Th1**- T auxiliar 1

**Th2**- T auxiliar 2

**TNF-α**- Fator de necrose tumoral alfa

**SFB**- Soro Fetal Bovino

**SDS**- Sodium Dodecyl Sulfate

**UFMG**- Universidade Federal de Minas Gerais

**v/v** - volume por volume

**µg**- Micrograma

**µg/mL**- Micrograma por Mililitro

**µL**- Microlitro

**µM**- Micromolar

**WHO**- Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema da lâmina no ensaio de proteção <i>in vitro</i> .....	29
<b>Figura 2.</b> Esquema de imunização com peptídeos e lipossomos ou extrato solúvel de <i>L. chagasi</i> .....	30
<b>Figura 3.</b> Reatividade dos soros de cães frente ao antígeno de <i>Leishmania chagasi</i> .....	34
<b>Figura 4.</b> Reatividade das imunoglobulinas purificadas .....	35
<b>Figura 5.</b> Reatividade dos fagos após Pannings 1, 2 e 3 .....	36
<b>Figura 6.</b> Reatividade dos fagos após o terceiro ciclo de seleção frente a Igs purificadas .....	37
<b>Figura 7.</b> Reatividade dos clones positivos frente a IgG normal de cão .....	39
<b>Figura 8.</b> Reatividade dos clones selecionados frente a IgG de cão anti <i>T. cruzi</i> .....	40
<b>Figura 9.</b> Perfil de eluição do peptídeo sintético em coluna de fase reversa C18 em sistema de HPLC .....	41
<b>Figura 10.</b> Análise por espectrometria de massa do pico purificado com massa estimada de 1886 Da (Dalton) .....	42
<b>Figura 11.</b> Análise da reatividade dos peptídeos sobre a membrana com pool de soros positivo e negativo .....	43
<b>Figura 12.</b> Ensaio de infectividade <i>in vitro</i> .....	44
<b>Figura 13.</b> Reatividade dos soros de camundongos imunizados com peptídeos 12A, 11H, não relacionado (NC) e antígeno frente a eles próprios .....	44
<b>Figura 14.</b> Carga parasitária por mg de baço de animais infectados com <i>L. chagasi</i> .....	45
<b>Figura 15.</b> Produção de IFN- $\gamma$ e IL-10 por cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados .....	46

## **RESUMO**

*Leishmania chagasi* é um dos principais agentes etiológicos causadores de Leishmaniose Visceral e apresenta ampla distribuição geográfica no Brasil. A leishmaniose visceral é um problema de saúde pública e se não tratada pode levar à morte. Neste trabalho foi avaliada a eficácia protetora contra a infecção por *L. chagasi*, induzida pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados pela técnica de Phage Display. Os níveis de proteção também foram avaliados através da quantificação da carga parasitária, bem como da resposta celular gerada pela imunização. Peptídeos foram selecionados com anticorpos IgG anti extrato solúvel antigênico de *L. chagasi* de cães com leishmaniose visceral. Foram achados três clones para interagir com IgG anti *L. chagasi* e os peptídeos sintéticos correspondentes foram sintetizados pelo método de Spot em membrana de celulose. Os epitopos 11H (KCPSIPGAVLCV) e 12A (ICARQDPAGNCS) que foram reconhecidos em Spot pelas IgGs anti *L. chagasi*, o extrato solúvel de *L. chagasi* e um peptídeo não relacionado (NC) foram encapsulados em lipossomos e usados como imunógenos. Apenas nos grupos de camundongos imunizados com o peptídeo 12A e antígeno solúvel foi possível verificar a indução de anticorpos. Nosso resultado referente a resposta celular não se mostraram conclusivos, visto que não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de camundongos estudados. A proteção induzida contra *L. chagasi* pela imunização com peptídeos sintéticos foi observada após 30 dias de infecção. Os resultados sugerem que o grupo imunizado com o peptídeo 11H e 12A apresenta um número menor de parasitas por mg de tecido, quando comparado aos grupos controles. Os resultados iniciais sugerem que estes peptídeos podem se tornar candidatos a uma vacina contra a leishmaniose visceral canina

## **ABSTRACT**

*Leishmania chagasi* is one of the most important etiological agents which can cause visceral leishmaniasis and gives wide geographical distribution in Brazil. Visceral leishmaniasis is a public health problem and is untreated can lead to death. In this work, the protective efficacy against *L. chagasi* infection has been evaluated in BALB/c mice by immunization with synthetic peptides selected by Phage Display technique. The protective levels through parasitary charge and cellular immune response were also evaluated. Peptides were screened with specific to soluble *L. chagasi* antigenic extract IgGs antibodies from dogs suffering visceral leishmaniasis. Three clones were found to interact with anti- *L. chagasi* IgG and the corresponding synthetic peptides were synthesized by the Spot method on cellulose membrane. The 11H (KCPSIPGAVLCV) and 12A (ICARQDPAGNCS) epitopes recognized in Spot-ELISA by anti-*L. chagasi* IgG, the soluble extract of *L. chagasi* and a non related peptide, were encapsulated by liposomes and used as immunogens. The humoral response were observed only in groups immunized with 12A peptide and *L. chagasi* soluble extract. Our results about cellular immune response were not concluded. The protection against *L. chagasi* by immunization with synthetic peptides were found thirty days after infection. The results detected that the groups immunized with 12A and 11H peptides showed lower levels of parasites than control groups. The initial results showed that those peptides can be considered to compose a vaccine against canine visceral leishmaniasis.

## **1- INTRODUÇÃO**

As Leishmanioses são um complexo grupo de doenças causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* que infectam macrófagos de uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem e o cão (De Luca *et al.*, 1999; Nieto *et al.*, 1999). Nas Américas, pelos menos oito espécies diferentes de *Leishmania* são os maiores agentes etiológicos da leishmaniose, incluindo *L. chagasi* e *L. amazonensis*, que se encontram em largas áreas de transmissão e estão associadas com a Leishmaniose Visceral (LV) e Tegumentar (LT), respectivamente (Grimaldi *et al.*, 1989; Grimald & Tesh, 1993).

A gravidade da doença alcança desde lesões cutâneas simples, de cura espontânea, até a forma visceral da doença, fatal, se não tratada. Cerca de 500 000 novos casos de leishmaniose visceral são registrados anualmente (Nunes *et al.*, 2008). Os cães domésticos e selvagens são os principais reservatórios da doença (Madeira, *et al.*, 2006).

Em meados dos anos 1980, constatou-se uma transformação nos padrões epidemiológicos da LVA, cuja doença, antes restrita às áreas rurais do nordeste brasileiro, avançou para outras regiões indenes alcançando a periferia de grandes centros urbanos. A partir dos anos 1990, os Estados do Pará e Tocantins (região norte), Mato Grosso do Sul (região centro-oeste), Minas Gerais e São Paulo (região sudeste) passaram a figurar de maneira significativa nas estatísticas da LVA no Brasil (Ministério da Saúde, 2006). Devido a este fato, a LV passou a ser foco de preocupação para os órgãos de Saúde Pública (Silva *et al.*, 2001).

Nos humanos, as manifestações clínicas decorrentes das infecções por *Leishmania* são variadas e inespecíficas e incluem febre irregular de longa duração, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, epistaxe, debilidade progressiva, dentre outros. Quando não tratada a tempo, geralmente evolui para a morte em consequência do estado clínico do paciente (Alencar & Neves, 1982).

Nas Américas, pelos menos oito espécies diferentes de *Leishmania* são os maiores agentes etiológicos da leishmaniose, incluindo *Leishmania chagasi* e *L. amazonensis*, que se encontram em largas áreas de transmissão e estão associadas com a leishmaniose visceral e tegumentar, respectivamente (Grimaldi *et al.*, 1989; Grimald & Tesh, 1993).

O cão é o mais importante reservatório quando se considera a forma zoonótica da doença (Moreno & Alvar, 2002). A importância deste hospedeiro se deve ao contato freqüente com outros cães e humanos e também ao fato de, na maioria das vezes, não apresentar sintomas quando infectado, apesar do alto grau de parasitismo na pele e vísceras (Madeira, *et al.*, 2004; Marzochi *et al.*, 1985). Por esse motivo, o cão é responsável pela manutenção do parasita nos focos endêmicos e, conseqüentemente, considerado um alvo estratégico no controle da enfermidade.

A apresentação clínica da leishmaniose visceral canina é conseqüência de interações complexas entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro (Santos-Gomes *et al.*, 2002). Sendo assim, os cães apresentam sintomatologia clínica variada, que vai desde aparente estado sadio, até grave estado terminal (Ciaramella *et al.*, 1997). Entretanto, apesar do alto grau de parasitismo nas vísceras, a maioria deles não apresenta sintomas (Alencar, 1959; Marty *et al.*, 1992; Madeira *et al.*, 2004).

Devido ao tratamento oneroso e pouco eficaz dos cães infectados e à inexistência de uma vacina totalmente eficaz, a eliminação de animais soropositivos tem sido utilizada como forma de controle da doença em vários países (Madeira *et al.*, 2006). As vacinas caninas já registradas no Brasil apresentam algum efeito protetor contra a leishmaniose visceral canina, mas nenhuma delas foi propriamente avaliada como medida de controle da leishmaniose humana (Parra *et al.*, 2007, Fernandes *et al.*, 2008).

Em modelos murinos, após a cura da leishmaniose cutânea os animais adquirem imunidade. Tal fato tem estimulado experimentos visando o desenvolvimento de vacinas que possam atuar no controle da infecção (Scott *et al.*, 1987; Guimarães *et al.*, 1996; Reed & Campos-Neto, 2003).

Antígenos vacinais devem, preferencialmente, ser compartilhados por diferentes espécies do parasita e imunogênico na maior parte delas. Além disso, não devem interferir na proteção induzida por outros antígenos, quando presentes na mesma formulação (Beyrodt, *et al.*, 1997).

A proteção à re-infecção alcançada, em modelos murinos e humanos, após a cura da leishmaniose cutânea causada por *L. major*, tem sido a alavanca preconizada pela Organização Mundial de Saúde para estimular o desenvolvimento de vacinas que possam ser empregadas como uma das medidas alternativas no controle da doença (WHO, 1993).

Na década de 50, formas vivas do parasita *L. major*, introduzidas em pequeno número e em regiões não-expostas do corpo, eram administradas a fim de que o homem desenvolvesse a lesão cutânea e, posteriormente, apresentasse cura espontânea e proteção contra a re-infecção. Tal técnica, denominada de Leishmanização, deixou de ser recomendada, uma vez que um número significativo de pacientes não apresentava cura espontânea, necessitando de tratamento médico. Com a evolução da tecnologia biomédica, formas vivas atenuadas, extratos brutos, semipurificados ou purificados e, mais atualmente, proteínas recombinantes e plasmídeos de DNA contendo genes de expressão de proteínas do parasita passaram a serem utilizados na tentativa de se desenvolverem novos candidatos à vacina contra as leishmanioses.

Vacinas de peptídeos sintéticos, que induzem imunidade por células-T, são a grande promessa na prevenção e terapia de doenças infecciosas (Van der Burg *et al.*, 2006) e vêm sendo usados em protocolos de vacinação contra patógenos extracelulares e intracelulares (Lindeberg, 1999; Harlow, *et al.*, 1988; Thompson, *et al.*, 1994). Peptídeos sintéticos são fáceis de produzir em escala industrial, não possuem potencial de integração ou recombinação genética, omitem seqüências deletérias da proteína de origem, são quimicamente estáveis, não precisando de condições especiais de armazenamento e são livres de contaminantes virais ou bacterianos (Jackson, *et al.*, 2006).

Atualmente, técnicas inovadoras como *Phage Display* e *Spot Synthesis*, vêm sendo empregadas na identificação, caracterização e produção de substâncias sintéticas, utilizadas em estudos de proteção contra várias doenças em todo o mundo (Portefaix *et al.*, 2002; Hunt *et al.*, 2006; Padoa & Crowther, 2006; Sergeeva *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2007).

A expressão de peptídeos na superfície de fagos, *Phage Display*, apresenta uma nova alternativa na busca de antígenos candidatos a vacinas em diferentes doenças. Esta técnica que consiste na expressão de inúmeros peptídeos, oriundos de bibliotecas combinatórias de peptídeos expressos na superfície de bacteriófagos da classe M13, que permite a seleção de alguns destes que apresentem elevada especificidade a uma molécula alvo e, conseqüentemente, uma ligação com grande afinidade (Yu & Smith, 1996). A utilização de imunoglobulinas (classe IgG) purificadas a partir de amostras de soros específicas na seleção dos peptídeos é uma estratégia atrativa que pode ser aplicada em

diversas doenças, a fim de se identificar seqüências de aminoácidos específicas aos anticorpos presentes em tais amostras.

A principal vantagem desta técnica é a ligação direta que existe entre o fenótipo e o genótipo do fago e a possibilidade de crescimento da avidéz entre a molécula alvo e o ligante. Assim, é possível selecionar epitopos e mimotopos com potencial para serem usados como antígenos vacinais, utilizando-se, neste caso, soros de cães comprovadamente infectados com *L. chagasi* como fonte de seleção para os fagos de interesse.

A técnica de *Spot Synthesis*, por sua vez, baseia-se na síntese química de peptídeos, por meio de suas seqüências de aminoácidos identificadas pela técnica de *Phage Display* (Molina *et al.*, 1996). A síntese em grande escala dos peptídeos, por meio de *spots* é realizada em um curto período de tempo, utilizando-se apenas pequena quantidade de materiais de consumo e com um rendimento e pureza de produto extremamente elevado, principalmente quando comparado aos sistemas convencionais de purificação utilizados na obtenção de proteínas recombinantes.

As técnicas de *Phage Display* e *Spot Synthesis* utilizadas neste trabalho são menos onerosas em relação às empregadas para a produção de proteínas recombinantes, apresentam maiores rendimentos finais, são mais simples e úteis para exames em grande escala, adequando-se perfeitamente à condição atual dos países em desenvolvimento que são acometidos por inúmeras enfermidades e não apresentam uma infra-estrutura eficiente para o combate de tais doenças (Noya *et al.*, 2003).

## **2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1- O agente etiológico e morfologia do parasita:**

No Brasil, o agente causador da Leishmaniose Visceral é um protozoário da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* e da espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi*. As espécies do gênero *Leishmania* apresentam-se, basicamente, sob três tipos morfológicos: amastigota, promastigota e paramastigota. As formas amastigotas são parasitas de células do sistema fagocitário mononuclear (SMF) de vertebrados; as demais formas são encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado.

### **2.2- Vetor:**

São insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito-palha, tatuquira, birigui, entre outros. Apenas as fêmeas possuem hábitos hematófagos e são capazes de transmitir o parasita ao hospedeiro vertebrado. (Grimaldi & Tesh, 1993).

### **2.3- Ciclo Biológico e transmissão:**

Ao picar um animal infectado pra exercer o repasto sanguíneo, o inseto ingere, juntamente com o sangue, células do SMF, leucócitos e macrófagos parasitados com as formas amastigotas. No tubo digestivo dos insetos, para se adequar às condições fisiológicas existentes, estas se multiplicam e transformam-se em formas alongadas, flageladas e móveis denominadas de promastigotas procíclicas. No esôfago e faringe, estas sofrem uma nova transformação para a forma paramastigota. Posteriormente, ocorre um processo denominado metaciclogênese, no qual estas formas diferenciam-se em promastigotas extremamente ágeis, as promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes.

Desta forma, o ciclo se completa quando, o inseto, ao exercer novamente o repasto sanguíneo sobre um hospedeiro não infectado - homem ou cão - inocula as formas promastigotas metacíclicas, que são fagocitadas por células do SMF, como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, onde são formados os fagolisossomos, que se

fundem a lisossomos, formando os fagolisossomos. Para adaptação às novas condições fisiológicas intracelulares existentes, há a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas. Essas formas aflageladas, parasitas intracelulares obrigatórios, são responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro. Um novo vetor, não infectado, poderá ingerir células fagocíticas parasitadas após picar o hospedeiro vertebrado, completando-se, assim, o ciclo biológico do parasita.

#### **2.4- Epidemiologia:**

A Leishmaniose Visceral apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em vastas áreas tropicais e subtropicais do globo. Está amplamente distribuída nas Américas, desde a Argentina até aos Estados Unidos (Grimaldi, *et al.*, 1989). É considerada endêmica em 87 países (21 no Novo Mundo e 66 no Velho Mundo), com cerca de 90% de casos notificados em países subdesenvolvidos como Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão (Monteiro *et al.*, 1994).

Acredita-se que 12 milhões de pessoas sejam clinicamente afetadas pela doença. Segundo levantamentos da Organização Mundial de Saúde, cerca de 1,5 a 2 milhões de novos casos surgem a cada ano, dos quais 1 a 1,5 milhão correspondem a casos de leishmaniose tegumentar e cerca de 500.000 a casos de leishmaniose visceral. Por esses motivos, a OMS classificou as leishmanioses como uma das seis principais doenças tropicais que afetam países em desenvolvimento (WHO, 1993; Desjeux, 1996).

No Brasil, a leishmaniose visceral é considerada uma zoonose e há uma ocorrência anual de dois a três mil casos (WHO, 1990). A doença apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (WHO, 2003).

O Brasil registra 90% de todos os casos de LV que ocorrem no continente Americano. A região Nordeste do Brasil é a que possui o maior número de casos (70%-90%), seguido da região Sudeste (6%), região Norte (4%) e finalmente região Centro-Oeste (1%) (Monteiro *et al.*, 1994).

A migração indiscriminada da população rural para o meio urbano, acompanhada de animais domésticos como cães e gatos que podem se portar como reservatórios do parasita, tem contribuído para o aumento do número de casos em áreas urbanizadas e em grandes

cidades brasileiras como Campo Grande, Natal e Belo Horizonte, entre outras (Cunha *et al.*, 1995; Jeronimo *et al.*, 2004; Laison & Rangel, 2005; Oliveira *et al.*, 2006).

Belo Horizonte é considerada, atualmente, zona endêmica de LV (Alves & Bevilacqua, 2004) e convive, desde 1993, com uma epidemia desta doença. Nos últimos anos, o número casos humanos e caninos tem crescido, indicando um aumento na transmissão e também, a relevância do cão na prevalência desta doença (Silva, *et al.*, 2001). Devido a este fato, a LV assumiu importante papel na saúde pública (Marzochi *et al.*, 1994).

## **2.5- Patogenia da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)**

Na LVC, assim como em todas as doenças parasitárias, fatores específicos dependentes do hospedeiro e do parasita determinam o desenvolvimento dos mecanismos patogênicos da doença e das lesões. A apresentação clínica da doença, ou seja, a capacidade do animal desenvolver ou não a doença, é consequência de interações complexas entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro (Santos-Gomes *et al.*, 2002), o que faz com que os cães apresentem sintomatologia clínica variada, que vai desde aparente estado sadio, até grave estado terminal (Ciaramella *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria deles é assintomática (Marty *et al.*, 1992)

Diante da grande variação de sintomas clínicos, Mancianti *et al.* (1998) propuseram que os cães portadores da infecção fossem classificados em:

- Assintomáticos: cães aparentemente saudáveis, sem sintomas ou sinais clínicos;
- Oligossintomáticos: cães que apresentam perda de peso moderada, lesões de pele discretas e linfadenomegalia;
- Sintomáticos: cães que apresentam vários sintomas graves da doença, como dermatopatias (perda de pêlos, dermatite furfurácea e úlceras), onicogribose, ceratoconjuntivite e rigidez dos membros posteriores.

Ainda segundo os autores, cerca de 60% da população canina infectada não apresenta sintomas evidentes, sendo o restante, em sua maioria, casos pré-patentes, cuja infecção pode ou não evoluir para a fase patente.

Após a inoculação dos parasitas pelos flebotomíneos na pele de cães susceptíveis, a maioria é eliminada por fatores do complemento, enquanto outros sobrevivem usando

diferentes estratégias (Mosser & Rosenthal, 1993; Peters *et al.*, 1995; Dominguez & Toraño, 1999). No segundo caso, em alguns animais há o desenvolvimento de resposta imune adequada específica e controle da infecção, enquanto que em outros há disseminação dos parasitas da pele para os linfonodos, o baço e medula óssea e destes órgãos, para todo o organismo (Ferrer, 2002). O período de incubação da doença é extremamente variável, podendo ser de alguns meses até anos (Marzochi *et al.*, 1985; Ferrer *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 2001).

Dentre os sintomas da LV canina, as alterações dermatológicas são as mais comuns (Ciaramella *et al.*, 1997; Ayali & Baneth, 2001; Reis, 2001; Ferrer, 2002; Lima *et al.*, 2003; Amusatogui *et al.*, 2003; Solano-Galego *et al.*, 2004). O pêlo torna-se opaco e surge alopecia, que em conjunto com a onicogribose e edema das patas, são os sinais clínicos mais evidentes. Alguns animais doentes também podem apresentar outros sintomas como febre, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, perda de peso, hiperkeratose, despigmentação, ulcerações cutâneas particularmente no focinho, nas orelhas e na ponta da cauda, ceratoconjuntivite e uveíte. (Cunha, 1938; Deane & Deane, 1955<sup>b</sup>; Alencar, 1959; Genaro *et al.*, 1988). Alguns ainda podem desenvolver uma lesão específica no local da inoculação das formas promastigotas, o chamado *cancro de inoculação*.

Após as alterações cutâneas, o sintoma clínico mais comumente descrito na LVC é a linfadenomegalia, seja local ou generalizada (Ayali & Baneth, 2001; Reis, 2001; Ferrer, 2002; Lima *et al.*, 2003; Amusatogui *et al.*, 2003; Solano-Galego *et al.*, 2004). A onicogribose é um sinal marcante da doença canina, sendo observada em cerca de 25% dos cães com LV (Ciaramella *et al.*, 1997). Alguns autores atribuem a onicogribose à ação do parasita na matriz ungueal (Lestoquard & Donatien, 1938, citado por Genaro, 1993) e outros à ausência do desgaste natural das unhas devido à apatia do cão nos estágios mais avançados da doença (Marzochi *et al.*, 1985).

Em casos mais graves de envolvimento visceral generalizado, geralmente observa-se atrofia muscular com paresia das patas posteriores e/ou perda de peso que geralmente estão associadas à anorexia e outros sinais clínicos como depressão e poliúria (Ferrer, 1989). Nestes estágios mais avançados da doença, é possível observar, ainda, um quadro de disfunção renal relacionado às elevadas concentrações de imunocomplexos circulantes de IgM e IgA e à deposição destes nos glomérulos (Margarito *et al.*, 1998; Mancianti *et al.*,

1989). A resistência do hospedeiro está associada com a ativação seletiva e diferenciação da células efectoras T helper (TH) CD4+ do tipo TH1, que secretam um padrão de citocinas específicas, entre elas, IL-2 e IFN- $\gamma$  (Grimaldi & Tesh, 1993). Os animais infectados apresentam uma diminuição no nível de células TCD4+ em comparação a cães normais (Moreno & Alvar, 2002).

A presença das formas amastigotas nos órgãos provoca resposta inflamatória, inicialmente com predominância de neutrófilos e eosinófilos, que são seguidos por um grande número de macrófagos. Os linfócitos são observados posteriormente, com a progressão da doença, a inflamação se torna tipicamente granulomatosa (Ferrer, 2002). Ocasionalmente, a amiloidose grave pode ser encontrada no baço, fígado e rins de cães acometidos.

Diversas são as alterações bioquímicas e hematológicas já relatadas em cães naturalmente ou experimentalmente infectados, dentre elas, podemos citar: anemia normocítica normocrômica, elevação das proteínas totais do soro, diminuição de ferro, aumento de fibrinogênio plasmático e ceruloplasmina. As alterações bioquímicas estão relacionadas ao aumento da resposta humoral policlonal, que origina disproteinemia, traduzida por um aumento das proteínas séricas totais com hiperglobulinemia e hipoalbuminemia (Genaro, 1993; Cardoso & Cabral, 1998).

## **2.6- Diagnóstico e controle da LVC**

O diagnóstico inicial da leishmaniose é realizado pela avaliação de parâmetros clínicos e epidemiológicos, porém, para um diagnóstico definitivo, há a necessidade de exames que comprovem a presença do parasita. A especificidade e sensibilidade dos métodos dependem do tipo de antígeno utilizado, do tempo de infecção, da carga parasitária, e da resposta imune do hospedeiro. Há um grande número de testes com resultados falso-positivos e falso-negativos. Por esse motivo, os exames complementares são de fundamental importância no diagnóstico definitivo da doença (Ciaramella *et al.*, 1997; Ferrer *et al.*, 1997 ; Koutinas *et al.*, 1999 e Blavier *et al.*, 2001).

O aspirado de medula óssea e linfonodos é o método diagnóstico mais empregado, pois o encontro de uma só amastigota em esfregaços já é suficiente para determinar a positividade do exame (Tavares, Fernandes & Melo, 2003). A principal desvantagem deste

método, além do desconforto causado ao animal, é a sensibilidade de apenas 50% nos aspirados de medula óssea e menos de 30% naqueles de linfonodos (Ferrer, 1997). O nível de infecção no tecido recolhido também é importante, sendo que um diagnóstico mais difícil ocorre em casos onde a carga parasitária é menor (Ashford *et al.*, 1995).

O exame parasitológico é o método confirmativo para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Por meio dele, faz-se a detecção do parasita *Leishmania* a partir de biópsias de tecidos com lesão ou aspirados de líquidos corporais.

O teste de cultura *in vitro*, com a posterior identificação microscópica das formas amastigotas do parasita a partir da confecção de esfregaços de aspirados da medula óssea ou de linfonodos, é bem utilizado pelos veterinários no diagnóstico da doença (Ferreira *et al.*, 2003). O teste é rápido e apresenta elevada especificidade, entretanto, possui baixa sensibilidade, alcançando cerca de 60% em aspirados de medula óssea e 30% nos linfonodos (Ferrer *et al.*, 1997; Tavares *et al.*, 2003). Em muitos casos faz-se uso de anestésicos acarretando maior trabalho e maiores custos financeiros. Além disso, a identificação dos parasitas em esfregaços depende de treino, experiência e habilidade do examinador (Ayali & Baneth, 2001).

Historicamente, testes sorológicos utilizados no diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral (ELISA e RIFI) baseiam-se na detecção de anticorpos específicos ao parasita nas amostras de soro de cães suspeitos de portarem a doença. Tais exames são baseados na utilização de extratos de proteínas dos parasitas, antígenos semipurificados ou purificados, apresentados sob a forma de proteínas recombinantes (Grimaldi & Tesh, 1993; Carvalho *et al.*, 2002; Alvar *et al.*, 2004).

Como os testes sorológicos atualmente empregados apresentam baixa especificidade, animais vacinados e que desenvolvem sorologia positiva frente aos antígenos do parasita, por meio da influência da vacina em seu sistema imunológico, são sacrificados pelos Órgãos de Saúde competentes. Somam-se a este grupo, muitos cães que apresentam resultados falso-positivos nas triagens sorológicas, que acabam sendo sacrificados sem a necessidade, apenas como uma medida de controle da infecção. Além disso, uma porcentagem elevada de cães saudáveis, porém, residentes em áreas endêmicas de leishmanioses, podem apresentar sorologia positiva em testes sorológicos comumente empregados.

Recentemente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se apresentado como um método rápido e altamente sensível para o diagnóstico de LVC e tem se mostrado útil também no acompanhamento de cães doentes (Ferrer, 1997), pois é um método com alta sensibilidade e especificidade (Fisa, *et al.*, 2001). Essa técnica também parece capaz de distinguir infecção passada de recente (Blackwell, 1992).

Segundo estudos realizados por Quinnell *et al.* (2001), comparando o desempenho do ELISA, exame microscópico, cultura e PCR em biópsias de medula óssea, foi demonstrado que, nas amostras positivas para demonstração do parasita, o PCR apresentou sensibilidade de 98%, sendo mais alta (78-88%) no início da infecção. O ELISA também apresentou resultados que variaram de acordo com o tempo de infecção: 41% no início e 93-100% mais tarde. Com base nestes resultados, foi concluído que o PCR teve mais utilidade na detecção da doença ativa e que o ELISA é mais sensível para detecção da infecção em todos os cães.

O controle da leishmaniose visceral canina baseia-se na detecção dos animais infectados, seguido do seu sacrifício e no combate ao vetor transmissor. Tal controle, entretanto, é uma tarefa difícil devido à grande variedade de espécies do parasita, além disso, a leishmaniose apresenta-se como uma doença zoonótica que é mantida, em sua grande maioria, em ciclos naturais envolvendo vetores e reservatórios silvestres. Há também, a capacidade de adaptação do parasita que, mesmo na ausência de seu reservatório natural, pode sobreviver em outros hospedeiros presentes em seu habitat (Desjeux, 1992; Kamhawi, 2000).

Um outro fator que contribui para difícil o controle da doença é a ausência de uma vacina confiável e efetiva para preveni-la (Fujiwara *et al.*, 2005). A proteção à re-infecção alcançada, em modelos murinos e humanos, após a cura da leishmaniose cutânea causada por *L. major*, tem sido a alavanca preconizada pela Organização Mundial de Saúde para estimular o desenvolvimento de vacinas que possam ser empregadas como uma das medidas alternativas no controle da doença (WHO, 1993).

## **2.7- Resposta imune na leishmaniose murina**

Camundongos vêm sendo utilizados na tentativa de se identificar os fatores responsáveis pelos fenótipos de resistência e susceptibilidade à infecção pelo parasita

*Leishmania* (Launois *et al.*, 1996). Na modulação da resposta imune murina, o macrófago apresenta antígenos aos linfócitos T, que produzem e secretam citocinas que, por sua vez, induzem diferentes funções efetoras.

A resposta imune na LV é complexa e se difere significativamente dependendo do antígeno e local de infecção (Kaye *et al.*, 2004; Stanley & Engwerda, 2007).

A utilização do modelo murino permitiu a identificação de subtipos de LT que produzem e secretam citocinas que induzem diferentes funções efetoras. Os macrófagos são as principais células parasitadas por *Leishmania*. A capacidade destas células de destruir parasitas intracelulares é o principal mecanismo envolvido no controle da infecção. Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e óxido nítrico (NO), são os principais responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos. O NO é produzido nos macrófagos a partir da L-arginina, em uma reação catalisada pela enzima iNOS. Citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estimulam a expressão da iNOS; a IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , por sua vez, inibem a sua expressão, tornando a célula refratária à atividade parasiticida (Van der Veen, 2000; Brunet, 2001).

Estudos em modelos murinos demonstraram que a imunidade protetora na LV é mediada por células T e citocinas (Sheppard *et al.*, 1983; Scott *et al.*, 1989; Liew *et al.*, 1990).

A resistência do hospedeiro está associada à ativação seletiva e diferenciação de células efetoras T helper CD4<sup>+</sup> (Th1) que secretam um padrão de citocinas específicas, como IL-2, INF- $\gamma$ , IL-12 e o TNF- $\alpha$ , dentre outras. Por outro lado, a susceptibilidade à infecção está relacionada à resposta de células CD4<sup>+</sup> (Th2) que secretam citocinas específicas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dentre outras (Sher & Coffman, 1992; Launois *et al.*, 2002; Peters & Sacks, 2006).

O perfil de citocinas encontrado após a infecção por *Leishmania* é fundamental para o desenvolvimento de uma resposta imune benéfica ou prejudicial ao hospedeiro. O tratamento de camundongos BALB/c susceptíveis à *L. (L.) major*, por exemplo, com a IL-12 ou com anticorpo monoclonal anti IL-4, logo após a infecção desafio, induz a uma resposta imune protetora, associada com a produção de citocinas do tipo Th1. A utilização de anticorpo monoclonal anti IL-12 após o desafio, por sua vez, induz a doença em

linhagens de camundongos geneticamente resistentes a este parasita, como C57BL/6 (Launois *et al.*, 2002).

## 2.8- Vacinas e Leishmaniose Visceral Canina

Devido ao difícil controle da LV, vários trabalhos têm sido conduzidos visando o desenvolvimento de agentes profiláticos capazes de induzir imunidade protetora contra a doença (Kaur *et al.*, 2008). Segundo Ravindran *et al.* (2010), o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra LV é medida essencial para seu controle.

As estratégias empregadas pelas formas amastigotas de *Leishmania* para evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro mamífero são pouco conhecidas (Hall & Joiner, 1991). Alguns trabalhos sugerem uma interiorização dos antígenos de membrana para o citoplasma após as promastigotas metacíclicas serem inoculadas pelo vetor no hospedeiro (Alexander *et al.*, 1999). Outros sugerem que antígenos de virulência do parasita seriam os responsáveis pela evasão das defesas do hospedeiro, permitindo, desta forma, sua sobrevivência e possibilitando a ocorrência da doença (Shapira & Pinelli, 1989; Chang *et al.*, 2003).

O desenvolvimento de vacinas contra leishmaniose é uma das metas da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2000); dessa forma, pesquisas vêm sendo conduzidas no intuito de se identificar, isolar, caracterizar e purificar antígenos importantes do parasita para posterior utilização em protocolos de vacinação contra *Leishmania* (Button & McMaster, 1988; Fernandes *et al.*, 1997; Sjolander *et al.*, 1998; Stager *et al.*, 2000; Rafati *et al.*, 2001; Fragaki *et al.*, 2001; Oliveira da Silva *et al.*, 2001).

Vários laboratórios tem se dedicado ao desenvolvimento de uma vacina constituída de parasitas mortos. Apesar de alguns resultados promissores alcançados contra a leishmaniose cutânea em humanos, esses não são facilmente reproduzíveis (Mayrink, *et al.*, 1996; Armijos *et al.*, 1998; Marzochi *et al.*, 1998).

Uma das principais razões pelas quais ainda não se tenha desenvolvido uma vacina mais eficiente, é o fato de que, principalmente nas regiões tropicais, a doença é causada por várias espécies do parasita, cada qual com sua própria história natural, seus determinantes de virulência e patogenicidade (Grimaldi & Tesh, 1993). Neste contexto, um antígeno vacinal deve, preferencialmente, ser compartilhado por diferentes espécies do parasita e ser

imunogênico na maior parte delas, além de não interferir na imunogenicidade induzida por outros antígenos (Beyrodt *et al.*, 1997).

Segundo Kaur *et al.* (2008), um candidato em potencial para uma vacina contra leishmaniose visceral, deverá favorecer o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 CD4+, mas esta resposta também é dependente da dose do antígeno e da via de inoculação. A carga parasitária se mostrou menor em camundongos inoculados com promastigotas por via subcutânea, seguido da via intradérmica, intraperitoneal e intracardíaca.

De acordo com Ravindran *et al.* (2010), a imunidade protetora na LV está ligada à estimulação de uma resposta celular relacionada aos linfócitos Th1 e Th2. Além disso, o autor destaca a importância do adjuvante na eficácia e duração da resposta e afirma que vacinas lipossomais são muito eficazes na proteção contra LV em camundongos BALB/c. Estudos anteriores já demonstraram que adjuvantes como *Corynebacterium parvum* e lipossomos são utilizados com eficácia para um aumento da resposta imune à antígenos leishmaniais e indução de proteção contra LV (Afrin & Ali, 1997).

É necessário conduzir mais estudos na LVC no intuito de identificar os mecanismos de resistência ou susceptibilidade à infecção por *Leishmania* nesta espécie (Pinelli *et al.*, 1994).

## **2.9- A técnica de Phage Display: Expressão de peptídeos na superfície de fagos**

*Phage Display* (Smith, 1985) é uma técnica de seleção *in vitro* na qual uma proteína ou peptídeo é geneticamente fundido a proteínas de superfície de um bacteriófago filamentosos da classe M13, resultando na expressão de uma proteína heteróloga na superfície do capsídeo viral. A inserção de seqüências de nucleotídeos nos fagos é feita em uma região pré-determinada do genoma viral e permite a construção de uma biblioteca conformacional. Esta biblioteca possui uma população de ligantes em potencial. Cada membro da biblioteca apresenta uma forma distinta de peptídeo e, portanto, diferentes capacidades de interação deste com a molécula alvo. Fagos que apresentam em sua superfície peptídeos com especificidade de ligação desejada, podem ser selecionados da biblioteca através da ligação com uma molécula imobilizada e a seqüência do peptídeo selecionado pode ser deduzida da seqüência do DNA encapsulado (Scott & Smith, 1990).

Esta técnica possibilita a expressão de um grande número (maior que  $10^{11}$ ) de peptídeos ou proteínas na superfície de fagos (Sidhu *et al.*, 2000). Quanto maior for o número de formas representadas na biblioteca, mais facilmente será encontrado um ligante afim (Posner *et al.*, 1994).

A partícula viral do bacteriófago M13 é composta por cinco proteínas estruturais denominadas P3, P6, P7, P8, P9. No fago selvagem encontram-se cerca de 2800 cópias da proteína oito. Nas extremidades do capsídeo encontram-se de 3 a 5 cópias das demais proteínas estruturais. A P7 e P9 encontram-se na extremidade distal enquanto que a P3 e P6 estão na proximal. A incorporação de proteínas exógenas na superfície dos fagos é feita pela fusão destas às proteínas estruturais. As duas principais proteínas utilizadas para este fim são a P8 e P3. A P3 é necessária para o reconhecimento e infecção da célula e é a principal proteína estrutural para a apresentação de proteínas exógenas. A P8 é responsável por 99% da massa de proteína do fago.

Quando comparadas a outras bibliotecas de expressão, os sistemas utilizando fagos filamentosos apresentam vantagens. Uma delas é que fagos filamentosos não lisam as células infectadas, o que possibilita a separação de partículas virais do conteúdo intracelular, eliminando-se muito da reatividade cruzada com proteínas celulares.

Uma outra vantagem desta estratégia é a seleção de epitopos descontínuos, significando ser possível selecionar um mimotopo (Geysen *et al.*, 1986). A utilização de amostras de soros na seleção de peptídeos é uma estratégia atrativa que pode ser aplicada para várias doenças na tentativa de se identificar seqüências específicas que se liguem a anticorpos presentes nestas amostras (Manoutcharian, *et al.*, 1999).

## **2.10- Síntese de peptídeos em membrana de celulose. Método de Spot- Síntese**

A síntese de peptídeos sobre membrana de celulose permite a síntese rápida e eficiente de um grande número de peptídeos em delimitações pontuais por volume de deposição de cada resíduo de aminoácido.

Os aminoácidos são depositados em volume mínimo (0,6 uL) com auxílio de um micropipetador automático, permitindo obter aproximadamente 50 nanomols de peptídeo por ponto. A síntese múltipla foi realizada em sintetizador Abimed Spot Synthesis-ASP222, (Langenfeld, Alemanha) e o plano de distribuição dos aminoácidos, bem como a

determinação dos protocolos dos diversos peptídeos, foram definidos em programa de computação *Multipeps* (Molina *et al.*, 1996).

Os grupamentos hidroxilas livres sobre as membranas de celulose são utilizados como pontos de ancoragem para a síntese do peptídeo. Esses grupamentos são conjugados através de ligação estável com 8 a 10 unidades de polietileno-glicol (PEG), com o objetivo de afastar o peptídeo do suporte e conferir maior estabilidade na ligação do peptídeo à membrana.

A síntese do peptídeo inicia-se sempre pelo resíduo C-terminal da seqüência determinada. Com a desproteção do grupo ligado ao Fmoc pela adição de piperidina (20% em DMF), as funções aminas são recuperadas e podem ser visualizadas pela coloração azul com bromofenol. Os aminoácidos são em seguida ativados por DIPC/HOBT (150 µl cada aminoácido) e depositados para reinício de outro ciclo. As reações de ligação são seguidas por mudança de coloração dos Spots, passando da cor azul ao verde-amarelado.

As funções NH<sub>2</sub> livres ou que não reagiram, são acetiladas (anidrido acético 10% em DMF) para evitar a formação de peptídeos errados ou outras ligações indesejáveis. O grupo protetor Fmoc do próximo aminoácido é novamente eliminado em meio básico pela piperidina e verificado a ligação pela coloração com bromofenol. Efetuam-se lavagens da membrana com metanol, e após secagem ao ar fresco, esta membrana é posicionada no sintetizador para outro ciclo.

Pelo método de Spot, o tamanho do peptídeo sintetizado é limitado a 15-20 aminoácido (Laune *et al.*, 2002), pois há duvidas quanto a qualidade de ligação de peptídeos muito alongados ou grandes. Ao final da síntese, os grupos laterais dos aminoácidos são desprotegidos pela adição de ácido trifluoracético-TFA associado a diclorometano e trietilsilano e assim os peptídeos restam fixados de maneira covalente sobre a membrana.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1- OBJETIVO GERAL**

- Utilizar tecnologia peptídica (*Phage Display e Spot Synthesis*) para selecionar peptídeos capazes de induzir imunoproteção contra infecção experimental em camundongos BALB/c por *L. chagasi*.

#### **3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Selecionar epitopos/mimotopos utilizando anticorpos (da classe IgG) purificados a partir de amostras de soro de cães com leishmaniose visceral ativa (LVC) e de cães saudáveis, por meio da técnica de *Phage Display*.
- Extrair e seqüenciar o DNA dos bacteriófagos que expressem os peptídeos que demonstraram reatividade frente aos anticorpos anti- LVC .
- Sintetizar quimicamente, em membranas de celulose e na sua forma solúvel, os peptídeos identificados.
- Avaliar o perfil da resposta celular em camundongos BALB/c gerada pela imunização com peptídeos selecionados por Phage Display.
- Avaliar a influência do peptídeo 12A na proteção contra *L. chagasi* através de ensaio *in vitro* utilizando macrófagos de camundongos imunizados com peptídeos e antígeno solúvel do parasita.
- Avaliar, através da quantificação da carga parasitária, o grau de proteção nos animais imunizados com os peptídeos sintéticos.

## **4- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1- Amostras de soros**

Trinta e oito (38) soros de cães de várias raças, naturalmente infectados por *L. chagasi*, com resultados positivos por ELISA, RIFI e punção medular para leishmaniose foram utilizados neste trabalho. Amostras de soros de dezesseis (16) cães saudáveis, comprovadamente negativos (ELISA, RIFI), foram usadas como controles. Os soros foram obtidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais e o uso destes aprovado pelo comitê de ética para pesquisa clínica desta universidade. Quatro soros (4) de cães infectados com *Trypanossoma cruzi* (doença de Chagas) também foram utilizados como controles. Todos os soros foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior uso.

### **4.2- Parasitas e extrato solúvel de *Leishmania chagasi***

As cepas MHOM/BR/1972/BH46 de *L. chagasi* e o extrato solúvel protéico (antígeno) utilizados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Prof. Ricardo Toshio Fujiwara, do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG).

Os parasitas foram cultivados em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma, EUA), em estufa de oxigênio à temperatura de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Repiques foram efetuados até que os parasitas se encontrassem em fase logarítmica de crescimento.

Os antígenos solúveis de *L. chagasi* foram obtidos a partir do cultivo de massa de promastigotas em meio LIT. A massa final de parasitos foi inicialmente submetida a três ciclos de congelamento e descongelamento e posteriormente sonicada por ultrassom (Sonifier Cell Disruptor<sup>®</sup>- Branson Sonic Power Co. – EUA) durante 1 minuto a 40 Watts, em banho de gelo. A sonicação foi repetida por sete vezes, com intervalo de 1 minuto entre as sonicações. Em seguida, o material sonicado foi centrifugado a 3000 g por 1 hora e 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante coletado e transferido para tubos cônicos de diálise (Centricon 5 kDa, Millipore, EUA) e então submetido à centrifugação a 3000 g por 30 minutos. Por fim, o material remanescente foi filtrado em filtros estéreis descartáveis, de  $0,22\ \mu\text{m}$ , em condições de fluxo laminar. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford. As amostras foram armazenadas em alíquotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### **4.3- ELISA dos soros de cães positivos e negativos**

Para confirmar a presença ou ausência de anticorpos antiantígeno de *Leishmania chagasi* nos 38 soros positivos e nos 19 soros negativos de cães, foi realizado um ensaio de ELISA como descrito abaixo:

- Os poços de uma microplaca de polietileno (FALCON) foram sensibilizados durante um período que variou entre 12 e 16 horas, a 4°C, com 100µL/poço (volume padrão) de solução de tampão carbonato 0,02 M, pH 9,6, contendo o antígeno de *L. chagasi* (5 µg/ml)
- A placa foi lavada com solução de lavagem (PBS com Tween a 0.05%) cinco vezes para a retirada do antígeno que não aderiu à fase sólida.
- O bloqueio dos sítios livres foi feito com 100µL de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS 0,05M, pH 7.4) a 37°C durante 1 h.
- A placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem e em seguida realizada a reação com soros de cães positivos (38) e negativos (16) diluídos 1:500 em tampão de incubação (caseína 0.25% em PBS 0.05M, pH 7.4 e 0.05% Tween 20), a 37°C durante 1h.
- Por inversão, retirou-se todo o soro dos poços que foram lavados seis vezes com solução de lavagem. Foram adicionados 100µL de tampão de incubação com anticorpo anti-Ig normal de cão conjugado a peroxidase diluído (1:1000), a 37°C durante 1h.
- As cavidades foram lavadas seis vezes com solução de lavagem. A atividade enzimática foi revelada através da adição de 100µL de solução reveladora (2mg de OPD e 2µL de peróxido de hidrogênio para 10 mL de tampão citrato (0,05 M pH 5,0).
- A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A interrupção da reação foi feita com 20µL de solução de ácido sulfúrico (1:20) e a leitura espectrofotométrica feita a 492 nm (SpectraMax 340)

#### **4.4- Extração e purificação de imunoglobulinas anti-*L.chagasi* e normais para seleção de fagos específicos no biopanning**

A extração das imunoglobulinas, do isotipo IgG para a seleção de fagos específicos presentes nos soros dos cães com LV e dos animais normais (grupo controle), foi realizada de acordo com o protocolo da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (1998) . Os *pools* de soros (positivos e normais) foram precipitados através da adição de sulfato de amônio e

posterior filtração em coluna de Proteína A-Sepharose 4B. Após eluição e neutralização, as IgGs foram dialisadas contra PBS e a concentração destas determinada por espectrofotômetro (260:280 nm) Gene Quant II apparatus (Pharmacia Biotech).

Após a extração, foi realizado um ensaio de ELISA para verificação da reatividade das imunoglobulinas de cão anti-*L.chagasi* e normais frente ao antígeno.

As IgGs anti-*L.chagasi* e normais purificadas foram testadas por ELISA e utilizadas como moléculas na bio-seleção dos peptídeos expressos nas superfície de fagos (**PHAGE DISPLAY**).

#### **4.5- Teste de ELISA para verificação da reatividade das IgGs purificadas**

Foi realizado um ensaio de ELISA para verificação da reatividade das imunoglobulinas de cão anti-*L.chagasi* e normais frente ao antígeno. A metodologia utilizada está descrita abaixo:

- Os poços de uma microplaca de polietileno (Falcon) foram sensibilizados durante um período que variou entre 12 e 16 horas, a 4°C, com 100µL/poço (volume padrão) de solução de tampão carbonato 0,02 M, pH 9,6 contendo o antígeno de *L. chagasi* dissolvido em tampão carbonato pH 9.6.
- A placa foi lavada com solução de lavagem (PBS com Tween a 0.05%) três vezes para a retirada do antígeno que não aderiu à fase sólida.
- O bloqueio dos sítios livres foi feito com 150µL de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS 0.05M, pH 7.4) a 37°C durante 1h.
- A placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem e em seguida realizada a reação com as IgGs de cães anti-*L.chagasi* e normais diluídas em tampão de incubação (caseína 0.25% em PBS 0.05M, pH 7.4 e 0.05% Tween 20), a 37°C durante 1h.
- As placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem. Foram adicionados 100µL de tampão de incubação com anticorpo anti-Ig total de cão conjugado a peroxidase diluído 1:1000, a 37°C durante 1h.
- As cavidades foram lavadas seis vezes com solução de lavagem. A atividade enzimática foi revelada através da adição de 100µL de solução reveladora (2mg de OPD e 2µL de peróxido de hidrogênio para 10mL de tampão citrato 0,05M pH 5,0).

- A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A interrupção da reação foi feita com 20µL de solução de ácido sulfúrico (1:20) e a leitura espectrofotométrica feita a 492 nm (SpectraMax340).

#### **4.6- Técnica de Phage Display**

##### **4.6.1-Seleção de peptídeos expressos na superfície dos fagos (Biopanning)**

Para a seleção de moléculas capazes de se ligar especificamente à imunoglobulinas do soro de cães com leishmaniose visceral, foram utilizadas quatro bibliotecas que apresentam peptídeos de 12, 15, 17 e 30 aminoácidos. As bibliotecas foram obtidas por J. Scott (Simon Fraser University, Burnaby BC, Canadá). Os fagos foram selecionados após três ciclos consecutivos de seleção e amplificação, a fim de se aumentar a especificidade das ligações. A bio-seleção foi feita de acordo com protocolo descrito por SMITH em 1985, com algumas modificações:

- Uma placa de Petri de polietileno (10 x 1.5 cm, Falcon 1029) foi sensibilizada com as imunoglobulinas purificadas do soro de cães com LV, numa concentração de 100µg/mL em coating buffer (NaHCO<sub>3</sub> 100mM pH 8,6), overnight a 4°C, sob leve agitação.

- Os anticorpos não ligados foram removidos por cinco lavagens de dois minutos com solução de lavagem (TBS 50mM, NaCl 150mM, Tween 0.05%, pH 7.5). A placa foi bloqueada com a adição de 100µL/well de solução de bloqueio (TBS 50mM, NaCl 150mM, Tween 0.05%, pH 7.5, BSA 3%) overnight a 4°C.

- Após cinco lavagens de dois minutos com solução de lavagem, 5x10<sup>12</sup> fagos de cada biblioteca foram adicionados a placa, em 10 mL de TBS 50mM, NaCl 150mM, Tween 0.05%, pH 7.5, para incubação com anticorpos, overnight a 4°C.

- Os fagos que não se ligaram foram removidos por dez lavagens de dois minutos com NaCl/Tris (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.5) e cinco lavagens de dois minutos com solução de lavagem.

- Os fagos ligados foram eluídos através da incubação com o respectivo competidor (no caso, o antígeno de *L.chagasi*), 10µg/mL de TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, Tween 0.05%, PH=7.5), *overnight* a 4°C, sob agitação.

- A amplificação dos fagos eluídos foi iniciada com a adição destes em cinco ml de uma cultura de células de *Escherichia coli* K-91 (Densidade ótica a 550nm = 1.8,) em meio LB, que se encontrava em fase exponencial de multiplicação. Depois de uma incubação de dez minutos a 37°C, as bactérias infectadas foram selecionadas com adição de tetraciclina ao meio (0.2µg/mL de meio) por trinta minutos a 37°C, com agitação a 225 rpm. Em seguida, foi adicionada tetraciclina em maior quantidade, 20µg/mL de meio, para a seleção final das bactérias infectadas e conseqüentemente, resistentes. As bactérias infectadas foram colocadas a 37°C overnight com agitação de 225 rpm para propagação.

- A suspensão da cultura de células foi lavada com duas centrifugações (4000 em seguida 8000 rpm). Os fagos resultantes foram separados do sobrenadante por precipitação em 20% de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000 20% 2.5M NaCl), overnight no gelo.

- O precipitado foi coletado após duas centrifugações a 8000 rpm, a 4°C (40 e 10 minutos). O *pellet* foi dissolvido em 3 mL de Tris/NaCl, e incubado a 37°C por trinta minutos com agitação de 150 rpm e essa solução foi transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugados para retirar qualquer vestígio de bactéria (10 minutos 15000 rpm).

- O sobrenadante foi armazenado a -20°C. Após a obtenção dos fagos, estes eram titulados para se iniciar um novo ciclo de bio-seleção, com o objetivo de aumentar a especificidade de ligação dos peptídeos selecionados em relação às moléculas alvo empregadas.

- A titulação foi feita a partir de diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-12}$ ) dos fagos em meio LB líquido. Dez microlitros das diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  e  $10^{-12}$  foram utilizadas para infectar, separadamente, 200µL de uma cultura de *E. coli* em crescimento exponencial (Densidade ótica a 550nm = 1.8). Para otimizar a infecção, as células eram mantidas a 37°C por quinze minutos e a 37°C por mais quinze minutos com agitação de 225 rpm. O volume total de células (200µL) das diluições escolhidas foram plaqueados em meio LB ágar com Tetraciclina 20µg/mL. O título foi estabelecido a partir da maior diluição onde houve crescimento.

#### 4.6.2-ELISA para testar a reatividade dos fagos nos três ciclos de seleção

A fim de comprovar o aumento da afinidade dos fagos pela imunoglobulina anti-*Leishmania chagasi* em cada ciclo de seleção (Pannings), após o terceiro panning foi realizado um ensaio de ELISA, conforme o protocolo descrito abaixo.

- Uma placa para ELISA (Nunc/Polysorp) foi sensibilizada com imunoglobulinas do *pool* de soros de cães com leishmaniose visceral em uma concentração de 10µg/mL em coating buffer para Phage Display (NaHCO<sub>3</sub>100mM pH 8,6), 3 horas a 37°C.

- O bloqueio dos sítios livres foi feito utilizando-se uma solução PBS-Tween 0.1% Leite Mólico 2% durante uma hora a 37°C.

- A cada poço foram adicionados 10<sup>10</sup> fagos que foram eluídos de cada ciclo de seleção. Como controle negativo, foi utilizada a mesma concentração de fagos silvestres. A placa foi incubada por 2 horas a 37°C.

- Após esta incubação, as cavidades foram lavadas seis vezes com PBS-Tween 0,1% e incubadas a 37°C durante uma hora com anticorpo anti-fago M13 conjugado à peroxidase (Sigma) diluído 1:5000. As cavidades foram lavadas novamente seis vezes com PBS-Tween 0,1% e reveladas com 100µL de solução reveladora - 2mg de OPD para 10ml de tampão substrato (40mM citrato trissódico, ácido cítrico e 3.33ml de água oxigenada 30 volumes).

- A interrupção da reação foi feita com 20µL de solução de ácido sulfúrico (2N) e a leitura espectrofotométrica feita a 492nm.

#### 4.6.3- Screening de antígenos selecionados

Ao fim terceiro ciclo de seleção (Panning 3), foi feita uma titulação e colônias bem isoladas foram amplificadas para serem analisadas individualmente. As colônias foram transferidas, uma a uma, para uma placa de cultivo celular de 96 poços contendo 200µL de meio LB mais 20µg/mL de Tetraciclina que cresceu a 37°C overnight com agitação de 225rpm. Essa placa foi centrifugada a 1500rpm por 30 minutos e o sobrenadante da cultura, onde estão os fagos isolados, foi testado através da técnica de ELISA descrita abaixo:

- Uma placa para ELISA (Nunc/Polysorp) foi sensibilizada com imunoglobulinas do *pool* de soros de cães com leishmaniose visceral em uma concentração de 10µg/mL de coating buffer para Phage Display (NaHCO<sub>3</sub>100mM pH 8,6) overnight a 4°C.

- O bloqueio dos sítios livres foi feito utilizando-se uma solução PBS-Tween 0.1%/ Leite Mólico 2% durante uma hora a 37°C. A cada poço foram adicionados 50 µL do sobrenadante de cultura de *E.coli*, infectadas por clones individuais de fagos selecionados no terceiro ciclo de seleção previamente cultivados como descrito anteriormente, mais 50 µL da solução de bloqueio. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C.

- Após esta incubação, as cavidades foram lavadas 6 vezes com PBS-Tween 0,1% e incubadas a 37°C durante uma hora com anticorpo anti-fago M13 conjugado à peroxidase (Sigma) diluído 1:5000. As cavidades foram lavadas 6 vezes com PBS-Tween 0,1% e reveladas com 100µL de solução reveladora - 2mg de OPD para 10ml de tampão substrato (40mM citrato trissódico, mM de ácido cítrico e 3.33mL de água oxigenada 30 volumes).

- A interrupção da reação foi feita com 20µL de solução de ácido sulfúrico (2N) e a leitura espectrofotométrica feita a 492nm.

- Os clones que apresentaram densidade ótica a 492nm superior a 0.8 foram considerados positivos.

A mesma ELISA foi repetida utilizando-se IgG de cão normal como antígeno.

#### **4.6.4- Teste de reação cruzada dos clones positivos**

Com o objetivo de se selecionar apenas clones com alta especificidade contra anticorpos anti *L. chagasi*, foi feita uma ELISA como descrito no item 3.4.3, utilizando-se anticorpos de cão anti- antígeno de *Trypanosoma cruzi*.

#### **4.6.5- Subclonagem dos clones positivos**

Após os clones positivos serem identificados como descrito na etapa anterior; as bactérias aderidas na placa de cultura foram ressuspendidas em meio LB e novamente plaqueadas em meio LB ágar contendo tetraciclina 20µg/ml, durante a noite a 37°C. Uma colônia correspondente a cada clone positivo foi transferida para cinco ml de meio LB líquido com tetraciclina e submetido à agitação de 225rpm, durante a noite a 37°C. Após essa etapa, foi acrescentado a cada meio 1mL de glicerol e estes foram aliquotados e estocados a -80°C.

## **4.7- Seqüenciamento de DNA viral**

### **4.7.1- Extração do DNA**

Para extrair o DNA dos fagos selecionados no *screening*, foi usado o protocolo de extração *QIAprep Spin M13 purification procedure protocolo*, da QIAGEN. Este kit é designado exclusivamente para preparação da fita única de DNA do fago M13, utilizando colunas em microcentrífuga.

### **4.7.2- Dosagem do DNA**

Após a extração, foi feito um gel de agarose 1% e a ele adicionado 1ul do DNA viral. A título de comparação, foi utilizado um padrão de 250 ng de DNA.

### **4.7.3- Sequenciamento automático capilar**

Após a dosagem, 250 ng de cada DNA foram submetidos ao sequenciamento no aparelho *ABI Prism- 310 Genetic Analyser (Perkim Elmer)* localizado no NAGE (Núcleo de Análise e Expressão Genômica) do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG.

## **4.8- Identificação e análise de homologia dos peptídeos selecionados**

Para identificação dos peptídeos selecionados, primeiramente foi obtida a seqüência de nucleotídeos que codifica esses peptídeos através da análise das seqüências de DNA. Após a identificação dos nucleotídeos, foi usada a opção *DNA → protein select translate 3'5' frame 1*, do programa *proteomics tools* disponível em <http://www.expasy.ch> para identificar os peptídeos.

As seqüências dos nucleotídeos referentes aos clones seqüenciados, foram analisadas quanto a similaridade com outras seqüências já registradas em bancos de dados através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST- Altschul *et al.*, 1990) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

## **4.9- Síntese química manual do peptídeo em fase sólida – Método F-moc**

Após a obtenção das seqüências peptídicas, procedeu-se à síntese química para a produção dos epitopos.

O peptídeo selecionado foi sintetizado utilizando-se um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (gel), que usa aminoácidos especiais para síntese *in vitro*. Esses aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil metil oxicarbonila) e são acoplados à fase sólida que também se encontra protegida (resina). O protocolo foi executado conforme Merryfield (1965), introduzindo-se nele algumas modificações: 54mg da resina (Rink Amide-40 $\mu$ M) foram colocados em um tubo de síntese e o seu grupamento Fmoc foi liberado, cobrindo a resina com 3ml de piperidina 20% em DMF (Dimetilformamida). A resina foi lavada três vezes por 10 minutos com a solução mencionada, em agitação contínua à temperatura de 37°C. Todas as lavagens foram feitas com auxílio de uma bomba a vácuo.

O tubo de síntese foi lavado 3 vezes com 5ml de DMF por lavagem. Iniciou-se, então, o acoplamento dos aminoácidos Fmoc. A quantidade despendida para cada aminoácido foi equivalente a 160 $\mu$ M. O primeiro aminoácido a ser acoplado é ligado pelo seu grupamento carboxila ao grupamento amina da resina, formando uma ligação peptídica.

O primeiro aminoácido foi posto no tubo de síntese e para 160 $\mu$ M de aminoácido foram colocados 21.6mg de HOBt (hidroxibenzotriazol) e 25 $\mu$ L de DIPC (diisopropilcabodiimida). O DIPC e HOBt são reagentes que permitem a ativação da função COOH dos aminoácidos Fmoc.

Com DMF suficiente para cobrir toda a resina, o tubo ficou agitando por 180 minutos a 37°C. Após esse tempo, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado com auxílio de uma bomba a vácuo, e a resina lavada com DMF por 3 vezes.

O grupamento amina desse primeiro aminoácido acoplado foi desprotegido lavando a resina com 3 ml de uma solução de piperidina 20% em DMF três vezes de 10 minutos cada com agitação contínua à 37°C.

O segundo aminoácido, com seu grupamento amina protegido, foi colocado no tubo de síntese juntamente com o HOBt e DIPC e este foi processado exatamente como o anterior. Este ciclo foi repetido até que todos os aminoácidos do peptídeo estivessem acoplados.

Após o término do derradeiro ciclo, o último aminoácido foi desprotegido como os anteriores e a resina lavada 4 vezes, durante 5 minutos cada, com diclorometano. O peptídeo foi desligado da resina pelo uso de uma solução de clivagem contendo 2.5% de  $\beta$ -

mercaptoetanol, 2.5% de água, num volume final de 5mL de TFA (ácido trifluoracético). O tubo de reação ficou agitando com esta solução por 4 horas.

A solução com os peptídeos foi colhida com auxílio de uma bomba a vácuo e os produtos da síntese foram precipitados com éter gelado overnight a 4°C. O tubo foi lavado e centrifugado três vezes a 3000 rpm por 30 minutos, enquanto o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspensionado em água.

Após a obtenção do peptídeo, este foi liofilizado, purificado em HPLC e analisado em espectrômetro de massa para confirmar a exatidão da sequência.

#### **4.10- Purificação do peptídeo sintético**

Os peptídeos foram purificados por cromatografia em fase reversa utilizando a coluna Sephasil Peptide C18 – Shimadzu (volume 4.24 mL, diâmetro 0.46 cm e altura 15 cm) acoplada a sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Primeiramente, a coluna foi lavada com solução A (TFA 1.1% em água) por 10 minutos. Os componentes presentes foram eluídos, utilizando-se um gradiente que variou entre 0 e 25% de acetonitrila em 75 minutos (0 –10 minutos até 10% de acetonitrila e de 10-75 minutos até 25% de acetonitrila). Os 20 minutos seguintes foram utilizados para lavagem da coluna com acetonitrila 100%. Após a purificação, o peptídeo foi submetido à espectrometria de massa (Micromass Q-Tof- micro <sup>TM</sup>), e sua massa molecular foi confirmada.

#### **4.11- Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana**

Como outra forma de se verificar a reatividade dos clones positivos selecionados por Phage Display com soros de cães anti- *L.chagasi* e normais, estes foram sintetizados em membrana de celulose (método de Spot Síntese) e o ensaio realizado como descrito abaixo:

As membranas contendo os peptídeos sintéticos foram lavadas três vezes com TBS (Salina, KCl 0.002M, Tris 0,05M) pH 7.4 e incubadas por 24 horas com solução de bloqueio (GENOSIS, SU-07-250A) em TBS, contendo Tween-20 a 0,05% (T-TBS) e sacarose a 0.5%, à temperatura ambiente. Após bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com os *pools* de soros de cães negativo e positivo para leishmaniose visceral por 90 min à 37°C. Após novas lavagens, o conjugado (anticorpo anti-cão conjugado com

fosfatase alcalina) foi adicionado e mantido sob agitação por 90 minutos. Após duas lavagens com T-TBS e outras duas subseqüentes com CBS pH 7 por 10 minutos sob agitação à temperatura ambiente, adicionou-se o substrato para fosfatase (MTT-BCIP, Sigma) por 30 minutos.

A reação, interrompida após duas lavagens da membrana com tampão CBS pH pode ser visualizada pela presença de um precipitado azul sobre os peptídeos (spots) mais reativos.

Ao final dos ensaios imunológicos as membranas foram documentadas e em seguida submetidas a um tratamento de regeneração, para sua posterior reutilização. As membranas foram tratadas com dimetilformamida (DMF), reagente A (uréia 8M, 1% de SDS, 0.1% de 2-mercaptoetanol), reagente B (etanol/água/ácido acético na proporção 50:40:10 vol/vol/vol), e metanol para remover os complexos moleculares precipitadas sobre os peptídeos (três lavagens de 10 min cada). Este procedimento de regeneração permite o uso das membranas 30-40 vezes utilizando-se a mesma membrana para anticorpos policlonais e até 70 vezes para anticorpos monoclonais.

#### **4.12- Análise de infectividade *in vitro***

O peptídeo 12A foi utilizado como antígeno vacinal na infecção por *L. chagasi* em um ensaio como descrito a seguir;

Camundongos BALB/c (n=4) de 6 a 8 semanas receberam, por via intraperitoneal, 2 mL de tioglicolato 3%. Após 72 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, procedeu-se a assepsia da região abdominal com álcool 70% e, através de um pequeno corte, a pele foi rompida sem danificar o peritônio.

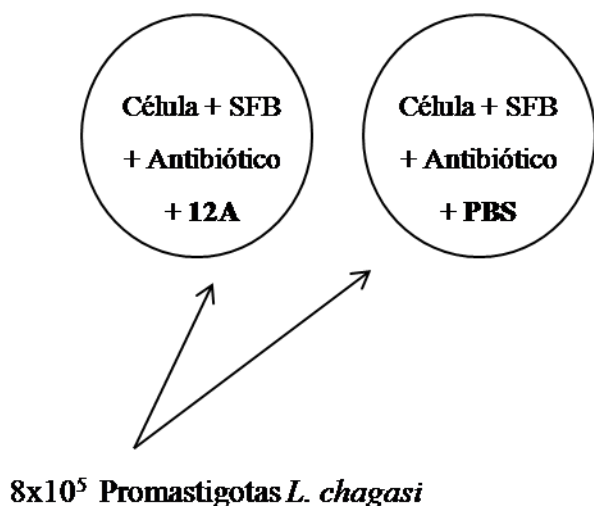
Para a retirada de macrófagos, foram inoculados 5 mL de PBS 1x estéril no peritônio dos animais. O líquido contendo as células foi aspirado novamente e colocado em tubos Falcon de 50mL para centrifugação (1400 rpm, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de antibiótico (sulfato de gentamicina). Estas foram então diluídas 20 vezes em solução de Azul de Tripán 0,4% e quantificadas em câmara de Neubauer.

Os macrófagos foram transferidos para placas de cultura de 2 wells (Tissue culture chamber/slides, Labtek) na concentração de  $4 \times 10^5$  céls/mL. Ao primeiro well foram

adicionados 22 $\mu$ M do peptídeo 12A e o outro recebeu apenas PBS. A placa foi armazenada em estufada de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

No dia seguinte, foram adicionadas à cultura 8 $\times$ 10<sup>5</sup> promastigotas metacíclicas de *L. chagasi* e a placa foi novamente armazenada por 48 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente (fig.1).

Após 48 horas, o sobrenadante foi coletado, a placa de cultura teve o fundo removido e colocado para secar à temperatura ambiente. Depois de secas, essas lâminas foram coradas com o kit Panótico Rápido (Laborclin) e o resultado foi analisado em microscópio.



**Fig.1- Esquema da lâmina no ensaio de proteção *in vitro***

#### **4.13- Preparação de lipossomos para imunização de camundongos**

Os peptídeos 12A, 11H, o extrato solúvel de *L. chagasi* (antígeno) e um peptídeo não relacionado (controle) foram sintetizados em sua forma solúvel e encapsulados em lipossomos para posterior imunização, de acordo com o protocolo descrito abaixo:

Para cada mL de lipossomo, foram solubilizados em clorofórmio 96,27 mg de fosfatidil colina de soja e 38,6 mg de colesterol. Para completa evaporação do clorofórmio, a solução foi submetida à agitação no rotavapor, a vácuo, em banho maria 20°C, até a formação do filme. Então, foi adicionada água deionizada ao balão volumétrico e este foi colocado novamente no rotavapor, com o vácuo desligado, por 45 minutos. A solução foi

transferida para um tubo falcon, sonicada por 10 minutos e centrifugada a 4°C, 3000G, 10 minutos. O precipitado foi descartado e para cada mL de sobrenadante, foram adicionados 2,1 mg de cada imunógeno (no caso, peptídeos). Após esse processo, os lipossomos foram congelados e liofilizados para posterior reidratação.

Na etapa de reidratação, cada mL de lipossomo foi suspenso em 67,14 µl de água deionizada, agitado no vórtex por 1 minuto e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. A etapa de agitação e incubação foi repetida por mais 3 vezes e então foram adicionados mais 67,14 µl de PBS e 9,4 µl de Hidróxido de Alumínio (AlOH<sub>3</sub>).

#### 4.14- Imunizações de camundongos com lipossomos

Antes de cada imunização, os lipossomos foram reidratados e a eles acrescentado AlOH<sub>3</sub>, como citado no item anterior.

Dois grupos de 20 camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas, foram utilizados neste trabalho para os ensaios de imunização (GRUPOS 1 e 2). O esquema de imunização está representado pela Fig.2. O primeiro foi utilizado para a infecção desafio e o segundo para dosagem de citocinas pós-vacina. Ambos foram separados em 4 subgrupos (A, B, C e D) de 5 animais e receberam seis doses das seguintes vacinas, de acordo com o esquema abaixo:

##### GRUPOS 1 e 2

- SUBGRUPO A: lipossomos contendo 50 µg peptídeo 12A
- SUBGRUPO B: lipossomos contendo 50 µg peptídeo 11H
- SUBGRUPO C: 50 µg antígeno solúvel de *L. chagasi*
- SUBGRUPO D: lipossomos contendo 50 µg peptídeo não relacionado

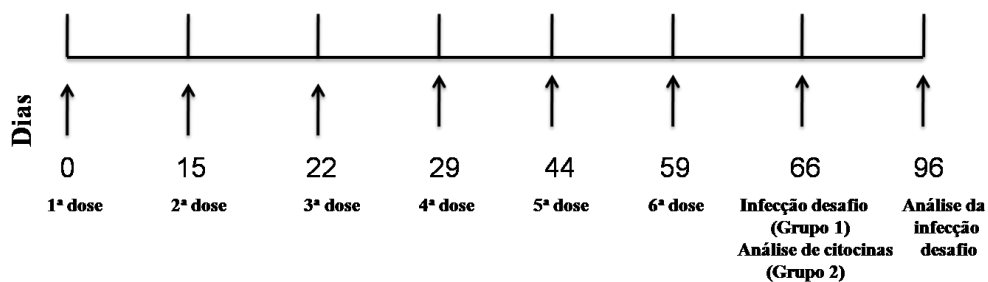


Fig.2- Esquema de imunização com peptídeos e lipossomos ou extrato solúvel de *L. chagasi*

#### **4.15- Elisa para verificação do título de anticorpos após ciclo de imunização**

Após o término da imunizações, para verificar a reatividade dos animais imunizados, uma placa de Elisa da marca Falcon foi sensibilizada com 0,5 ug/well de cada imunógeno e a ela foi adicionado o pool de soros dos animais na diluição de 1:100. Foi utilizado conjugado anti- mouse peroxidase (SIGMA), na concentração de 1:1000.

#### **4.16- Infecção desafio:**

A infecção desafio foi realizada nos camundongos do Grupo 1, uma semana após o término das imunizações com os lipossomos. Para tal, foram utilizadas  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L. chagasi* em fase estacionária de crescimento. Os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer, sendo ajustados para uma concentração final de  $1 \times 10^6$  promastigotas por animal e administradas por via intraperitoneal, em um volume final de 500µL em PBS. Como controle do experimento, outros 5 camundongos não imunes receberam também o inóculo de promastigotas.

#### **4.17- Análise da carga parasitária após infecção desafio**

Após a infecção desafio (4 a 5 semanas), foi realizado um PCR em tempo real, com o objetivo de se quantificar a carga parasitária nos animais do grupo 1, que foi determinada através do baço dos animais.

##### **4.17.1- Extração de DNA do baço**

A extração do DNA foi feita através do Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com o protocolo abaixo: • 10 mg do baço foram retiradas, colocadas em um tubo contendo 600µl de Nucleo Lysis solution e homogeneizadas por 10 segundos.

- O lisado foi incubado por 30 minutos em banho a 65°C.
- Em temperatura ambiente, adicionou-se 200µl de Protein Precipitation solution.
- Os tubos foram colocados no gelo 5 minutos e centrifugados a 14000g por 4 minutos.
- O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 600µl de isopropanol.
- O tubo foi invertido até a formação de uma massa branca.

- Foi feita uma centrifugação por 3 minutos a 14000g e o sobrenadante foi descartado.
- Foi adicionado ao tubo 600µl de etanol 70% e para lavar o DNA.
- O sobrenadante foi retirado e o tubo foi invertido para a secagem completa.
- 100 µl de DNA Rehydration solution foi adicionada ao tubo e este foi colocado em banho a 65°C por 1 hora.
- O DNA foi dosado no aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

#### **4.17.2- Real time PCR**

A PCR foi realizada utilizando-se 30 ng de DNA extraído do baço, 2,5 pM de primer F Linf.1-23F: 5'-TCCCAAACCTTTTCTGGTCCT-3', 2,5 pM Primer R Linf.1-154R:5'-TTACACCAACCCCCAGTTTC-3' e 10µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Warrington, UK). A reação foi desenvolvida no aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

A quantificação da carga parasitárias nas amostras foi feita através da comparação com uma curva padrão determinada pela reação de diferentes diluições (10 a 10<sup>8</sup>) de leishmanias em baços de animais não infectados.

#### **4.18- Análises pós vacinais:**

Uma semana após a última imunização, os camundongos do Grupo 2 tiveram o perfil da resposta imune celular avaliado através da produção de citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes das culturas de células.

##### **4.18.1- Isolamento e cultura dos esplenócitos**

Uma semana após a última imunização, procedeu-se a coleta do baço e cultura de esplenócitos. Para tal, os animais foram sacrificados e os baços coletados.

Os órgãos foram macerados em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de sulfato de gentamicina em tubos Falcon de 50 mL. Após a maceração, procedeu-se a lavagem das células e, em seguida, a lise de hemácias com tampão de lise (NH<sub>4</sub>Cl 0,15M, KHCO<sub>3</sub> 10mM, EDTA 0,1mM ), por 30 mim. As células foram então recuperadas por centrifugação (1500 G por 10 mim a 4°C) e ressuspensas em

3 mL de RPMI. A seguir, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração final de  $1 \times 10^6$  células por mL, sendo então diluídas em meio RPMI completo e plaqueadas em placas de 24 poços.

Cada subgrupo foi submetido ao estímulo de 4 antígenos diferentes. As células extraídas dos animais do subgrupo A, C e D foram estimuladas com peptídeo 12A, antígeno solúvel, peptídeo não relacionado e PBS (controle negativo). As do subgrupo B foram estimuladas com peptídeo 11H, antígeno solúvel, peptídeo não relacionado e PBS.

As concentrações dos peptídeos sintéticos e do extrato protéico solúveis de *L.(L.) chagasi* como antígenos estimuladores, foram as menores possíveis capazes de induzir a máxima produção das citosinas, definidas através de uma curva padrão dose-resposta. Assim, as concentrações de antígenos utilizadas foram de 10 ug/mL dos peptídeos e de 50 ug/mL de antígeno.

Após o acréscimo dos antígenos, as placas foram incubadas em estufa a 5% de CO<sup>2</sup> por 72 h a 37 °C. Após, os sobrenadantes foram coletados, armazenados a -80° C e utilizados nos experimentos de ELISA.

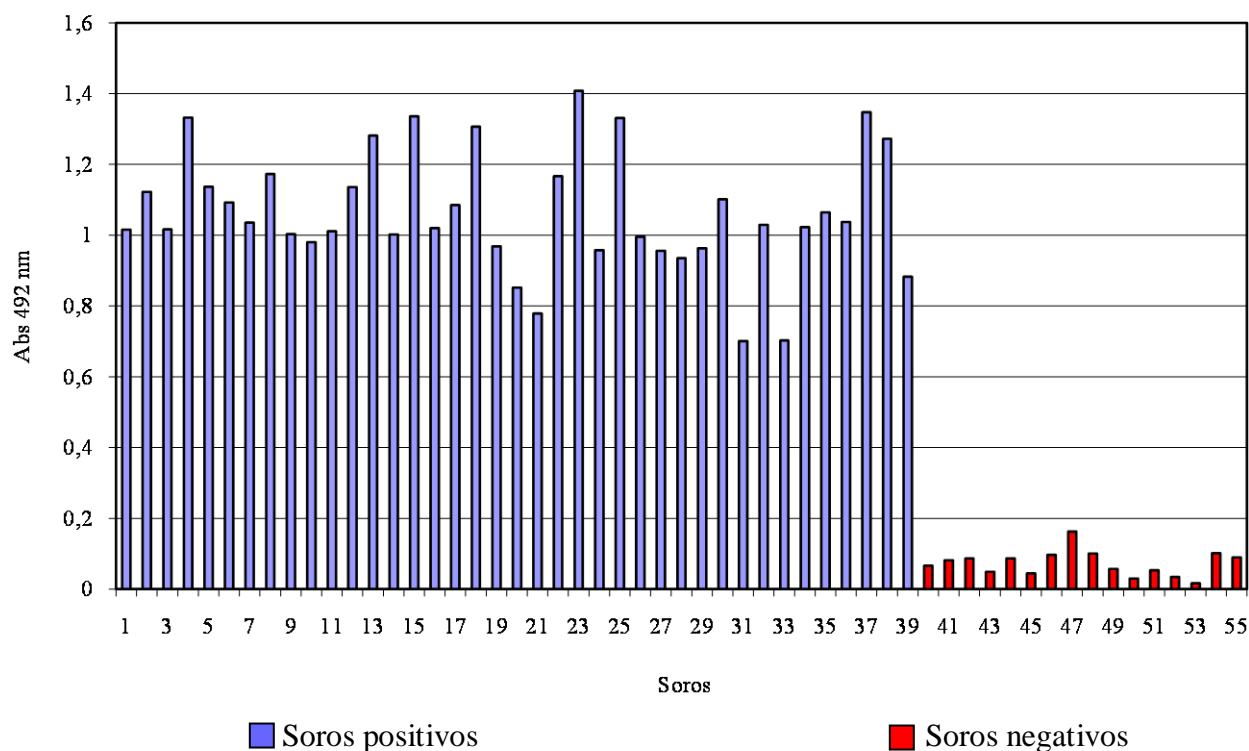
#### **4.18.2- Dosagem de citocinas**

O perfil da resposta imune celular foi avaliado através da produção das citocinas IFN-  $\gamma$  e IL-10, nos sobrenadantes das culturas das células após os estímulos. As dosagens foram realizadas por ELISA de captura, utilizando-se os kits Interest Mouse IFN- $\gamma$  ELISA kit, Interest Mouse IL-4 ELISA kit e Interest Mouse IL-10 ELISA kit (Pharmingen), de acordo com as instruções do fabricante.

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) do tipo Indireto para Leishmaniose Canina

Para confirmar a presença ou ausência de imunoglobulinas anti-antígeno solúvel de *Leishmania chagasi* nos soros dos cães positivos e negativos, foi feito um ensaio de ELISA. O resultado do teste está representado na figura 3.



**Fig.3 - Reatividade dos soros de cães frente ao antígeno de *Leishmania chagasi*.** A placa de ELISA foi sensibilizada com 0,5  $\mu\text{g}/\text{well}$  de antígeno. Os soros foram usados na diluição inicial de 1:500. Foi utilizado anticorpo anti-cão conjugado à peroxidase diluído 1:1000.

Verificamos que todos os 38 soros previamente diagnosticados positivos (RIFI, ELISA e punção medular) mostraram também reatividade com o antígeno solúvel desenvolvido nesta tese enquanto que os 16 soros negativos não apresentaram reatividade frente ao mesmo. Devido a estes resultados, foram feitos dois pools de soros, tanto de soros

positivos como de soros negativos para a extração de imunoglobulinas anti-*L.chagasi* e de imunoglobulinas normais para o próprio parasita.

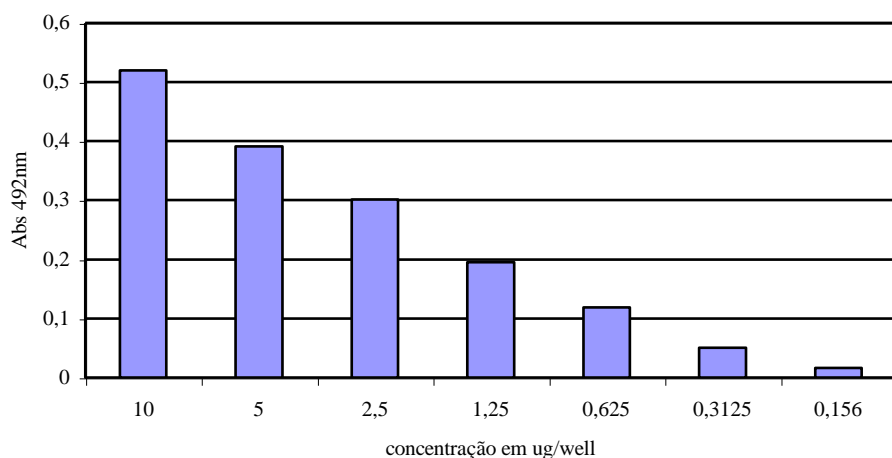
## 5.2- Reatividade das imunoglobulinas purificadas frente ao antígeno de *L.chagasi*

A purificação das imunoglobulinas IgGs anti-*L.chagasi* foi feita por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose segundo o protocolo descrito em material e métodos. Após purificação, um ensaio de ELISA indireto foi realizado com o objetivo de se verificar a reatividade destas imunoglobulinas frente ao antígeno.

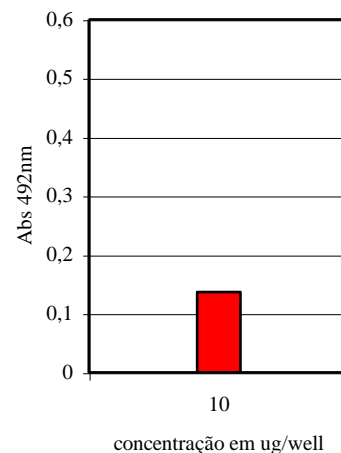
O resultado está representado na Figura 4. Verificamos em Fig. 4A que as IgGs anti- *L.chagasi* purificadas mantiveram sua reatividade numa forma diretamente proporcional à concentração de imunoglobulina utilizada. Na Figura 4B observamos também que as IgGs provenientes de cães normais não apresentaram reatividade frente ao antígeno.

IgGs anti-*L.chagasi* foram utilizados em seguida como ligantes na seleção de fagos específicos (Biopanning).

A)



B)

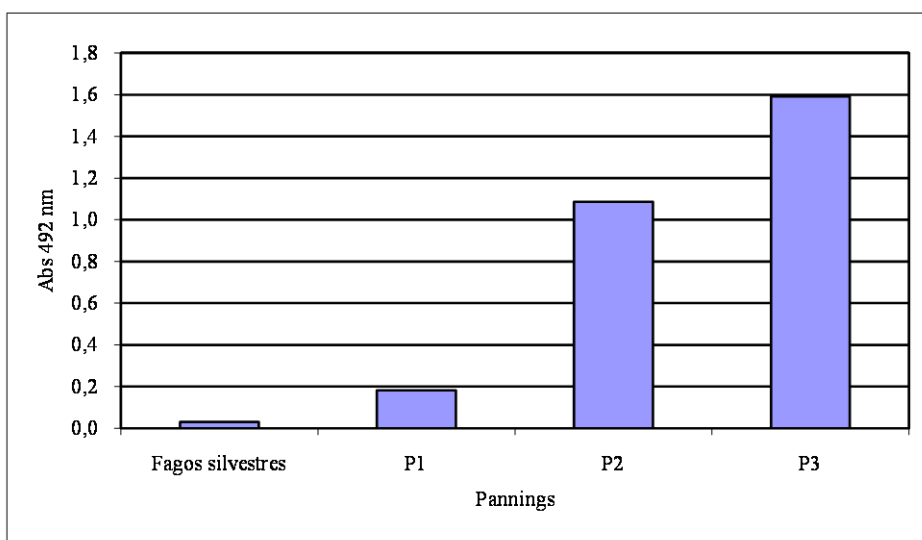


**Fig.4-A) Reatividade das imunoglobulinas purificadas.** A placa de ELISA foi sensibilizada com 0,5µg/well de antígeno de *L.chagasi*. A concentração das

imunoglobulinas variou de 10µg por well a 0,16µr por well. **B)** Controle negativo. Foi usada 10 µg de imunoglobulina do pool de soros negativos.

### 5.3- Reatividade dos fagos após três ciclos de seleção

Após três ciclos de seleção (Pannings 1, 2 e 3), foi feita uma ELISA tipo sanduíche para se verificar o aumento da afinidade entre os peptídeos expressos na superfície dos fagos e as imunoglobulinas anti- *L.chagasi* (figura 5). As imunoglobulinas usadas nessa ELISA foram as mesmas utilizadas na seleção inicial dos fagos (P1, P2 e P3). A metodologia de ELISA tipo sanduíche usada esta descrita em materiais e métodos.

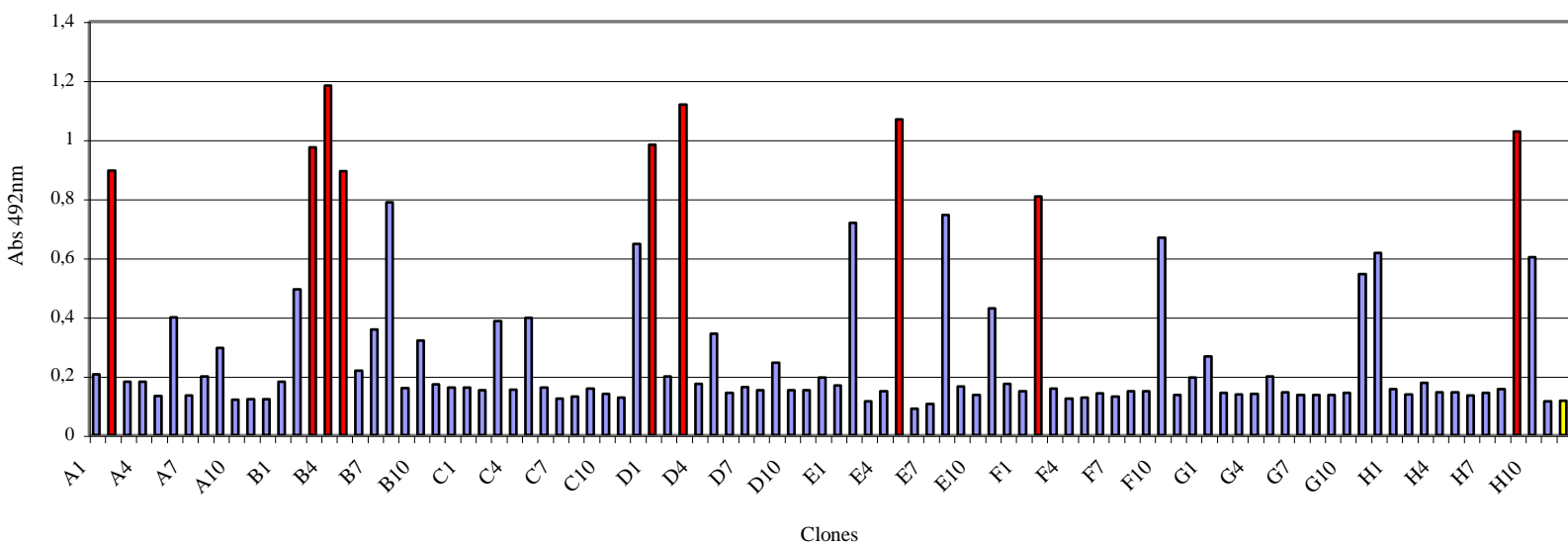
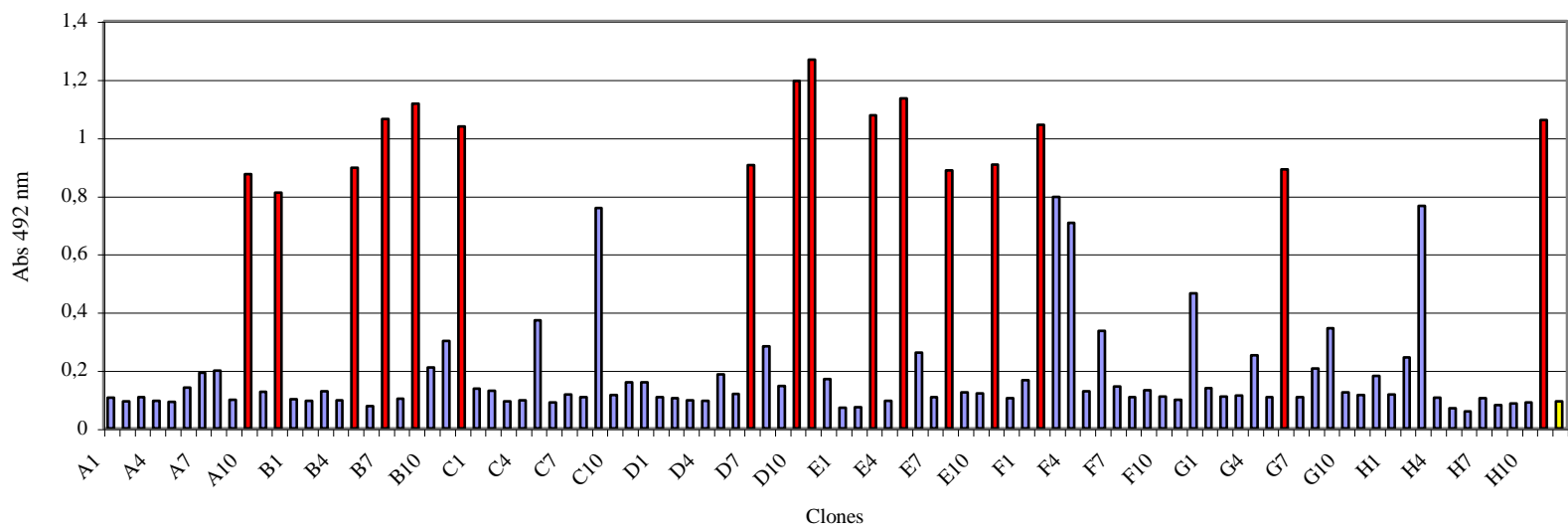


**Fig.5 - Reatividade dos fagos após Pannings 1, 2 e 3.** A placa foi sensibilizada com 10µg/mL do pool de Ig purificada anti *L. chagasi* e incubada com  $10^{10}$  dos fagos eluídos dos três ciclos de seleção (P1, P2 e P3) e fagos silvestres como controle negativo. Foi empregado anticorpo anti-M13 conjugado a peroxidase diluído 1:3000 (sigma).

Podemos observar na figura 5 que a reatividade dos fagos é maior no Panning 3, sugerindo que em cada ciclo a especificidade e a reatividade dos fagos amplificados são aumentadas.

## 5.4- Seleção dos fagos de interesse (Screening)

A análise da reatividade individual dos clones selecionados no Panning 3 foi realizada através de uma ELISA sanduíche conforme descrita em material e métodos no item 4.6.3. Foram sensibilizadas duas placas de ELISA com pool de imunoglobulinas anti-*L.chagasi* purificadas do soros de cães (10ug/mL). Como controle negativo foi usado sobrenadante de cultura de fagos silvestres. O objetivo desta etapa é a individualizar e selecionar apenas os clones com as maiores reatividades.



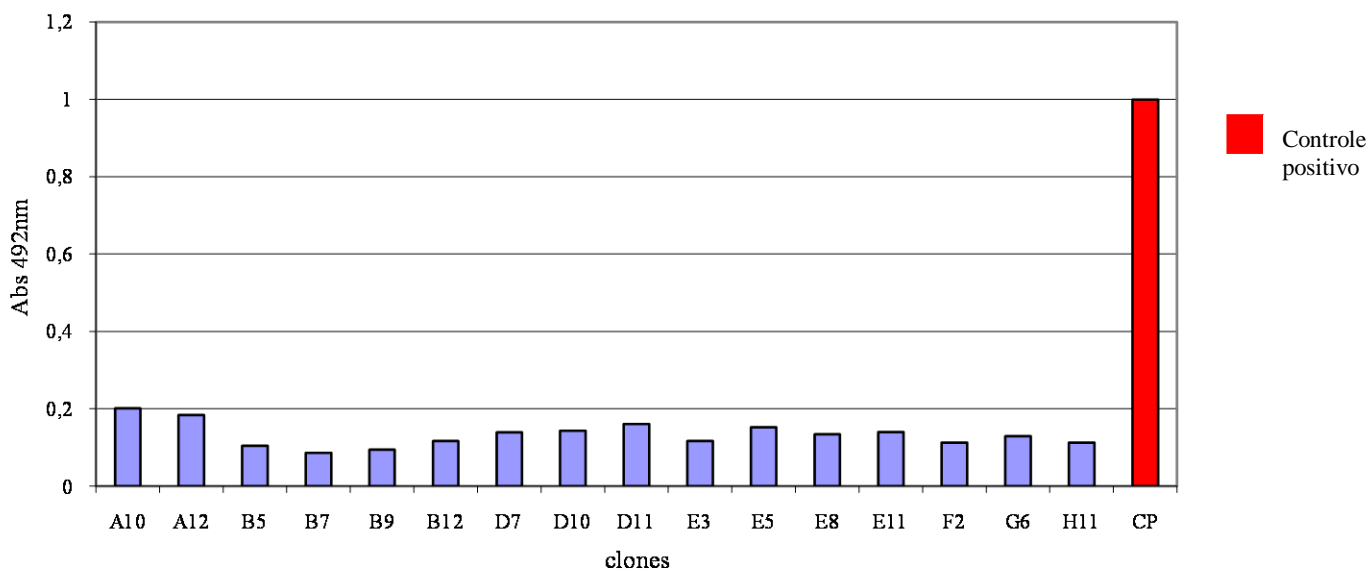
■ Fagos P3 Abs > 0.8   
 ■ Fagos P3 Abs < 0.8   
 ■ Fagos Silvestres

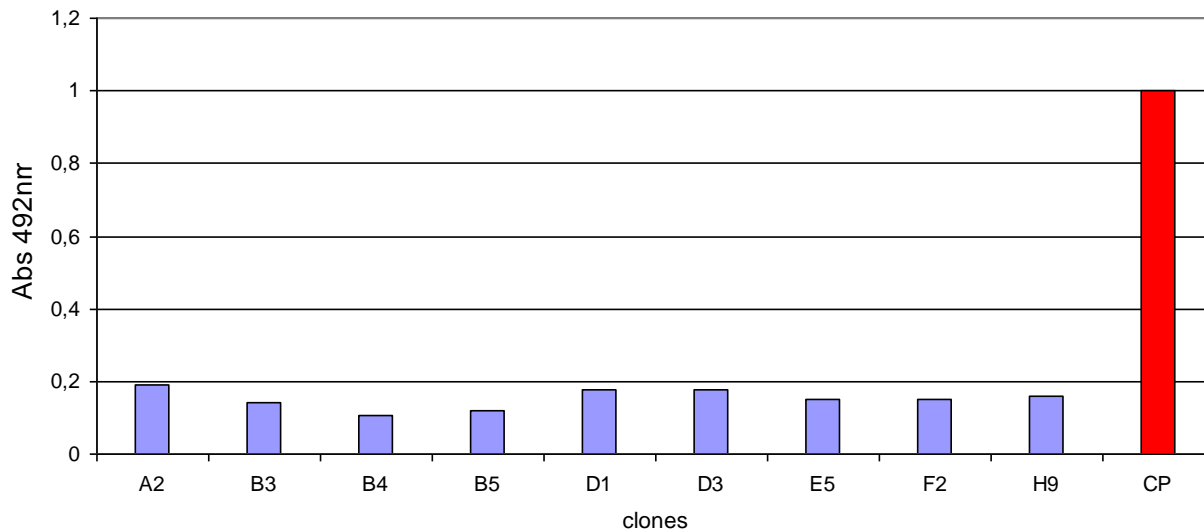
**Fig.6 – Reatividade dos fagos após o terceiro ciclo de seleção (P3) frente a Igs purificadas.** A placa foi sensibilizada com 0,5µg/well de IgG de cão anti- *L.chagasi* e incubada com 50µL do sobrenadante de cultura de de K91 contendo os fagos de interesse. Como controle negativo foi utilizado 50µL do sobrenadante de cultura de K91 infectada por fagos silvestres. Foi empregado anticorpo anti-M13 conjugado à peroxidase (sigma)

A figura 6 mostra uma grande variabilidade dos clones frente às IgGs anti *L.chagasi*. Aqueles com leituras maiores ou iguais a 0.8 (Abs 492nm) foram considerados positivos. De 192 clones dispostos inicialmente na placa, apenas 25 mostraram-se positivos. Estes clones foram selecionados para serem testados frente à imunoglobulina de cão anti- *T. cruzi*.

#### 5.5- Especificidade dos clones positivos frente a IgGs normais

Os 25 clones positivos tiveram sua reatividade analisada frente a imunoglobulinas de cães saudáveis. O resultado está representado na figura 7.



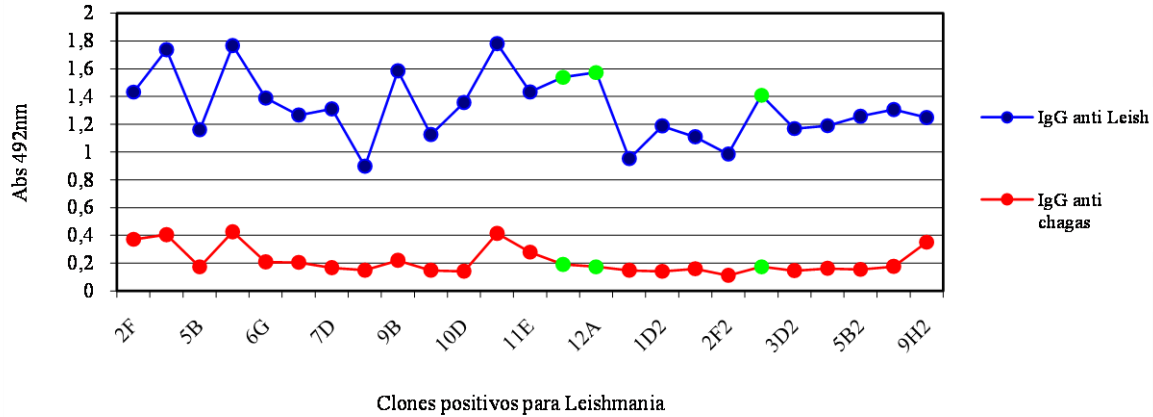


**Fig.7 – Reatividade dos clones positivos frente a IgG normal de cão.** A placa foi sensibilizada com 10 ug/well do pool de imunoglobulinas de cães do grupo controle e incubada com 50 $\mu$ L do sobrenadante de bactérias K91 com os fagos de interesse. Como controle positivo, a placa foi sensibilizada com o pool de IgG anti-*Leishmania chagasi* e incubada com 50 uL do sobrenadante de um dos fagos selecionados.

A figura 7 mostra que nenhum dos 25 clones positivos apresentou reatividade frente a IgG de cães do grupo controle. Os valores observados foram inferiores a 0.2 na absorbância de 492nm.

#### **5.6- Especificidade dos clones positivos frente a IgGs de cão anti-*Trypanosoma cruzi***

A especificidade dos clones positivos foi verificada novamente através do ensaio de ELISA, onde as microplacas de foram sensibilizadas com anticorpos anti *T.cruzi*.



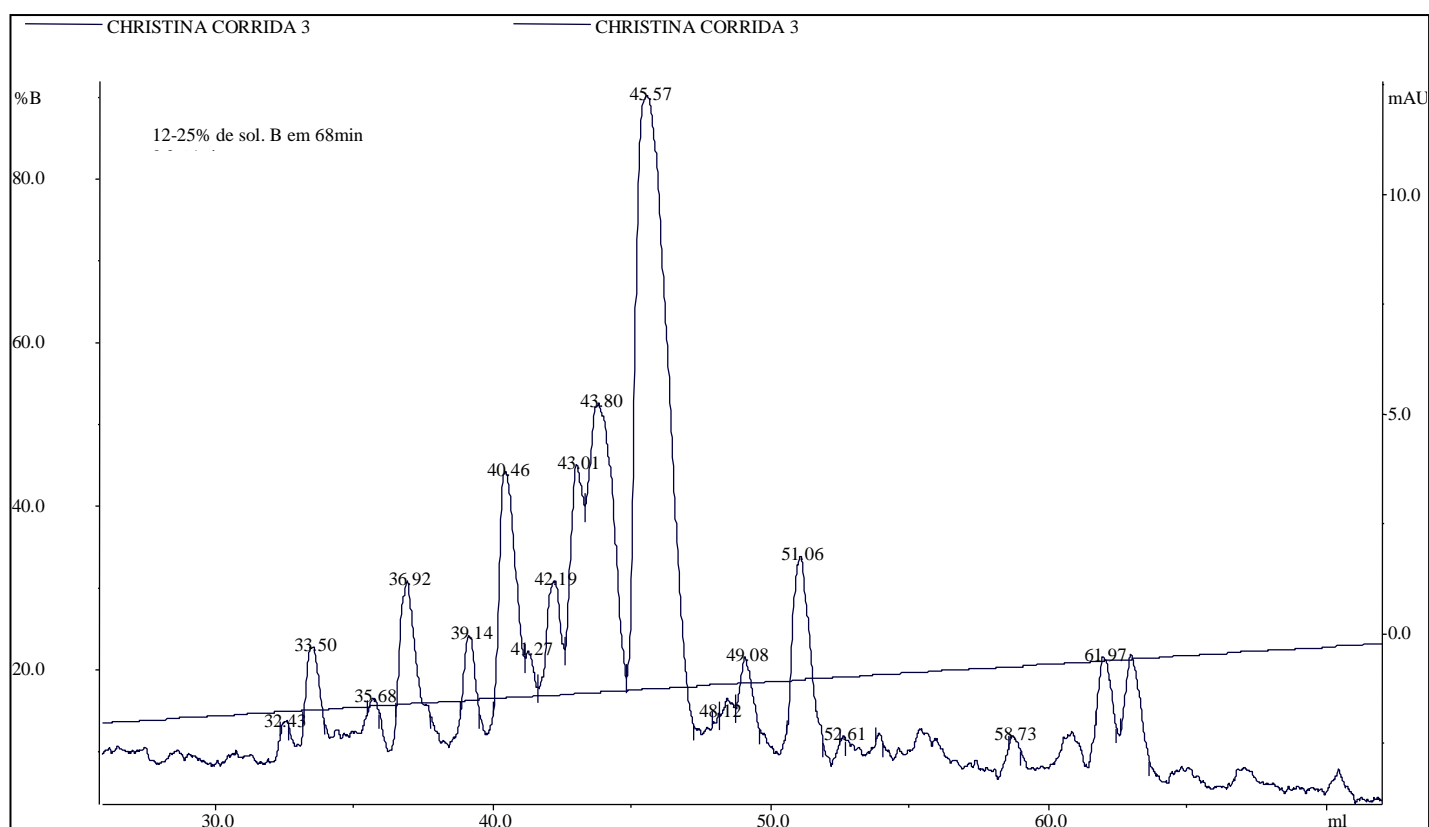
**Fig.8 – Reatividade dos clones selecionados frente a imunoglobulina de cão anti *T. cruzi*.** A placa de ELISA foi sensibilizada com 10µg/mL de Ig de cão chagásico e incubada com 50 µL de sobrenadante de cultura de K91 contendo os fagos selecionados (Abs > 0.8). Foi empregado anticorpo anti- M13 conjugado à peroxidase diluído 1:3000.

A figura 8 mostra a reatividade dos clones frente aos antígenos de *L.chagasi* (azul) e antígeno de *T.cruzi* (vermelho). Verificamos que a reatividade frente aos antígenos é muito variada; os valores de absorbância para anticorpo anti- *L.chagasi* variam de 0,9 (clones 9B, 1D2) a 1,8 (clones 6G e 11E), enquanto que para o anticorpo anti *T.cruzi*, esses valores variam de 0,1 (maioria dos clones) a 0,5 (clones 6G e 11E).

Os clones que apresentaram, respectivamente, alta reatividade (>1,4) contra anticorpos anti-*L.chagasi* e baixa reatividade (<0,2) contra anticorpos anti-*T.cruzi*, foram selecionados. Por estas características, apenas três clones (**3B, 11H e 12A**) foram selecionados e sintetizados para posteriores experimentos.

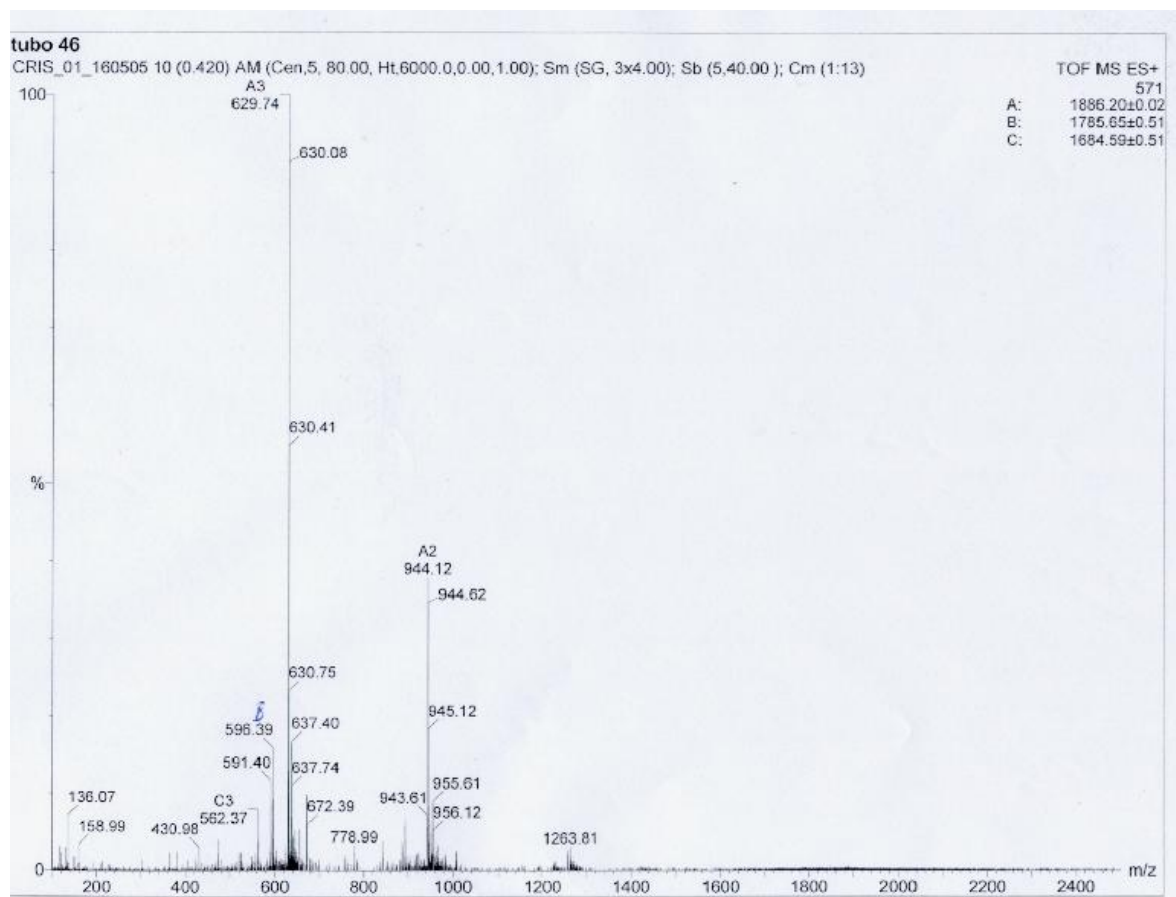
### 5.7- Purificação do peptídeo 3B

O peptídeo foi purificado por cromatografia em fase reversa utilizando a coluna Sephasil Peptide C18 – Shimadzu (volume 4.24 mL, diâmetro 0.46 cm e altura 15 cm) acoplada a sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). O perfil do fracionamento apresentou um pico principal quando foi utilizado um gradiente de acetronitrila que variou de 0 a 25% de acetronitrila em 75 minutos. O perfil cromatográfico está representado na figura 9. O pico principal foi liofilizado e sua análise foi realizada por espectrometria de massa, que confirmou a massa molecular do peptídeo.



**Fig.9- Perfil de eluição do peptídeo sintético 3B em coluna de fase reversa C18 em sistema de HPLC.**

## 5.8- Espectrometria de massa

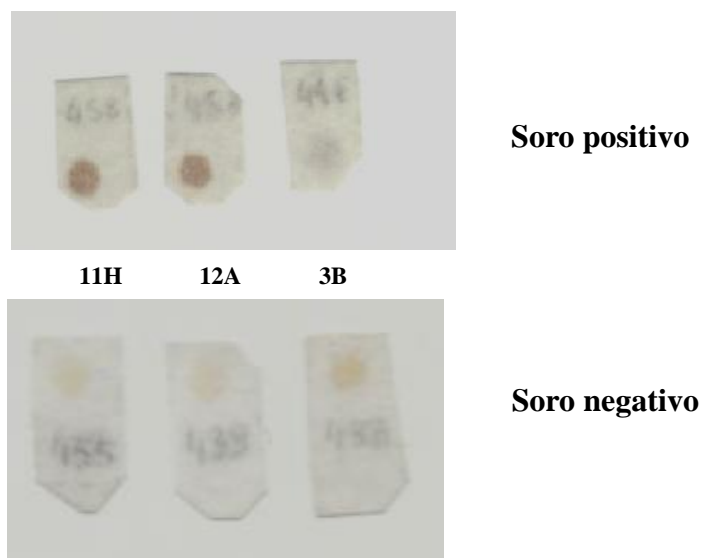


**Fig.10- Análise por espectrometria de massa do pico purificado com massa estimada de 1886 Daltons (Da).**

## 5.9- Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana

Após síntese dos peptídeos 11H e 12A em membranas (7 repetições de cada peptídeo) como descritos em material e métodos, estas membranas foram analisadas com soros negativo e positivo de cães para leishmaniose.

Os ensaios de imunoanálise das membranas foram realizados como descritos em materiais e métodos no item 4.11. O resultado está representado na figura 11.



**Fig.11- Análise da reatividade dos peptídeos sobre a membrana com pool de soros positivo e negativo.** Os soros foram usados na diluição 1:250. Foi empregado anticorpo anti-IgG de cão conjugada à peroxidase diluído 1:500.

De acordo com a figura 11, podemos perceber que os clones 11H e 12 A mostraram reatividade apenas frente aos soros positivos.

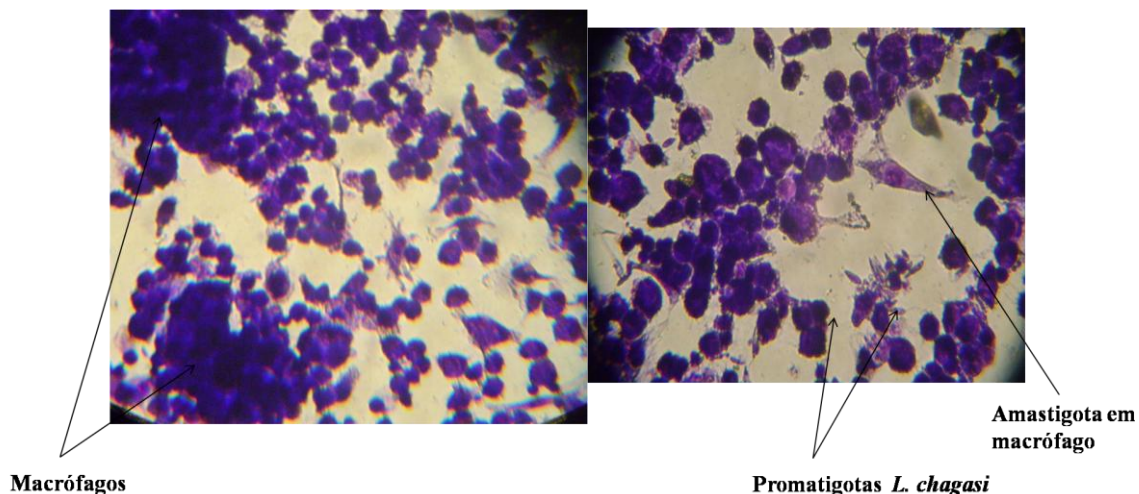
O clone 3B não reagiu também com o soro positivo ou negativo nestas condições.

### 5.10- Análise da infectividade *in vitro*

Para se verificar o comportamento do peptídeo 12A como indutor de proteção foi realizado um ensaio de infectividade *in vitro* como descrito no item 4.12. Macrófagos de camundongos BALB/c foram incubados com peptídeo 12A e PBS (controle negativo) e promastigotas de *L. chagasi*.

O ensaio de proteção não apresentou resultados possíveis de serem contabilizados ao microscópio óptico, devido à alta concentração de macrófagos utilizada nas placas. Houve uma sobreposição celular (grumos), o que não permitiu a diferenciar a quantidade de amastigotas presentes nos grupos de imunização.

A figura 12 ilustra o experimento de infectividade *in vitro*.

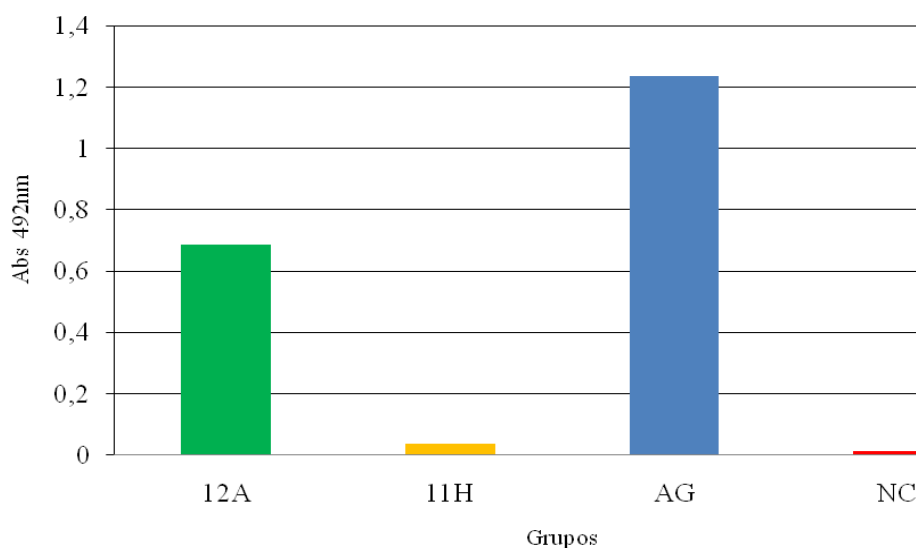


**Fig.12- Ensaio de infectividade *in vitro*.** Lâminas evidenciando sobreposição celular dos macrófagos e promastigotas livres de *L. chagasi* (aumento 400x).

### 5.11- Elisa para verificar a reatividade de anticorpos após imunização

Depois de completado o esquema de imunização, camundongos foram sangrados pelo plexo retro orbital e os soros obtidos foram avaliados por ELISA em um pool representativo de cada grupo de imunização.

Os resultados estão representados pelo gráfico da figura 13.

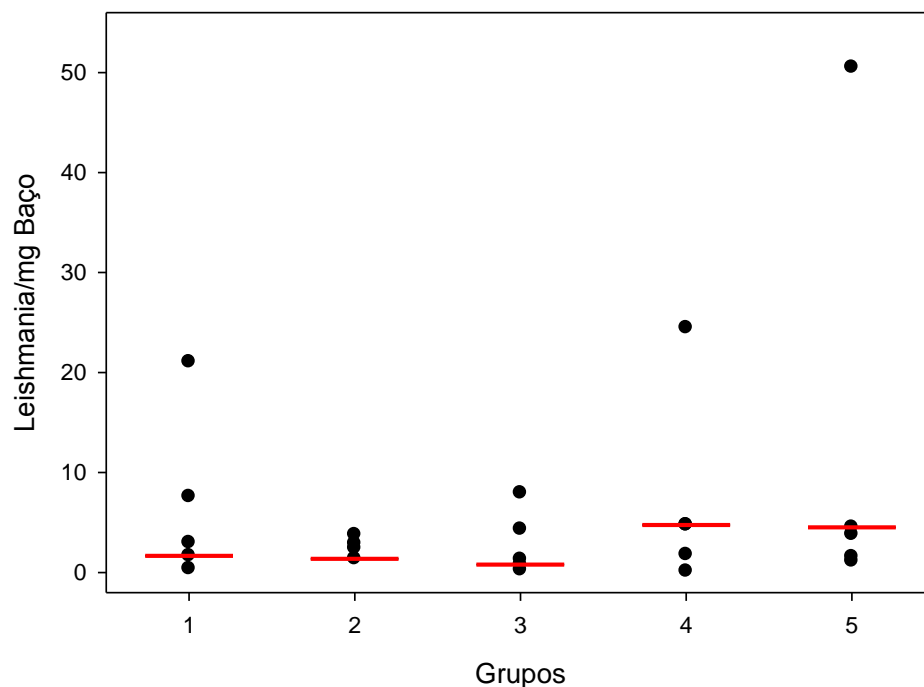


**Fig.13- Reatividade dos soros de camundongos imunizados com peptídeos 12A, 11H, não relacionado (NC) e antígeno frente a eles próprios.**

De acordo com o gráfico acima, podemos observar que os grupos imunizados com peptídeo 12A(verde) e antígeno solúvel de *L. chagasi* (azul) foram capazes de induzir anticorpos reativos contra o próprio imunógeno utilizado, enquanto que os soros dos animais imunizados com os peptídeos 11H (amarelo) e NC (vermelho) não apresentaram resposta frente a seus respectivos antígenos.

### 5.12- Análise da carga parasitária

Após realizada a infecção experimental dos camundongos BALB/c imunes e controles, foi avaliado o número de parasitas por mg de baço (carga parasitária) mensurado através A avaliação da carga parasitária foi mensurada através da técnica de PCR em tempo real (*Real Time PCR*). O resultado está representado pelo gráfico da figura 14.



**Fig.14 – Carga parasitária por mg de baço de animais infectados com *L. chagasi*.** Os grupos representam os animais imunizados (n=5). **Grupo 1-** peptídeo 12A, **Grupo 2-** peptídeo 11H, **Grupo 3-** antígeno solúvel de *L.chagasi*, **Grupo 4-** Peptídeo não-relacionado, **Grupo 5-** Animais não imunes (controle)

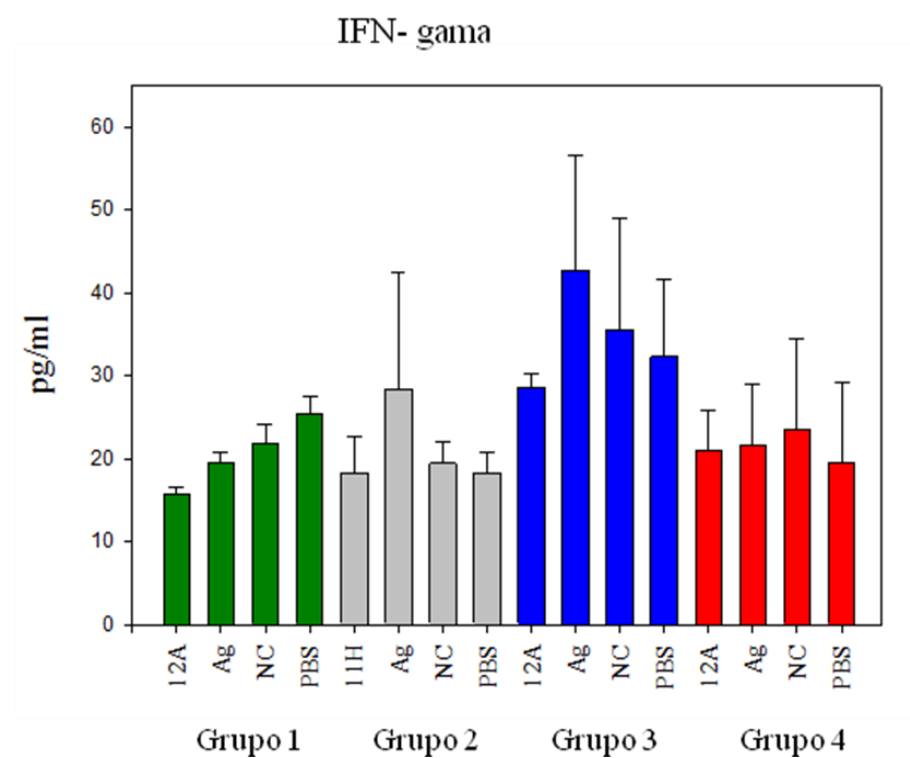
De acordo com a figura 14, podemos observar que a média de parasitas do grupo 4 e 5 (controles negativos) foi evidentemente maior que a dos outros grupos. Entretanto, não existe diferença estatística significativa entre eles. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de existir um grande desvio padrão entre os grupos estudados.

### 5.13- Avaliações da produção de citocinas por ELISA

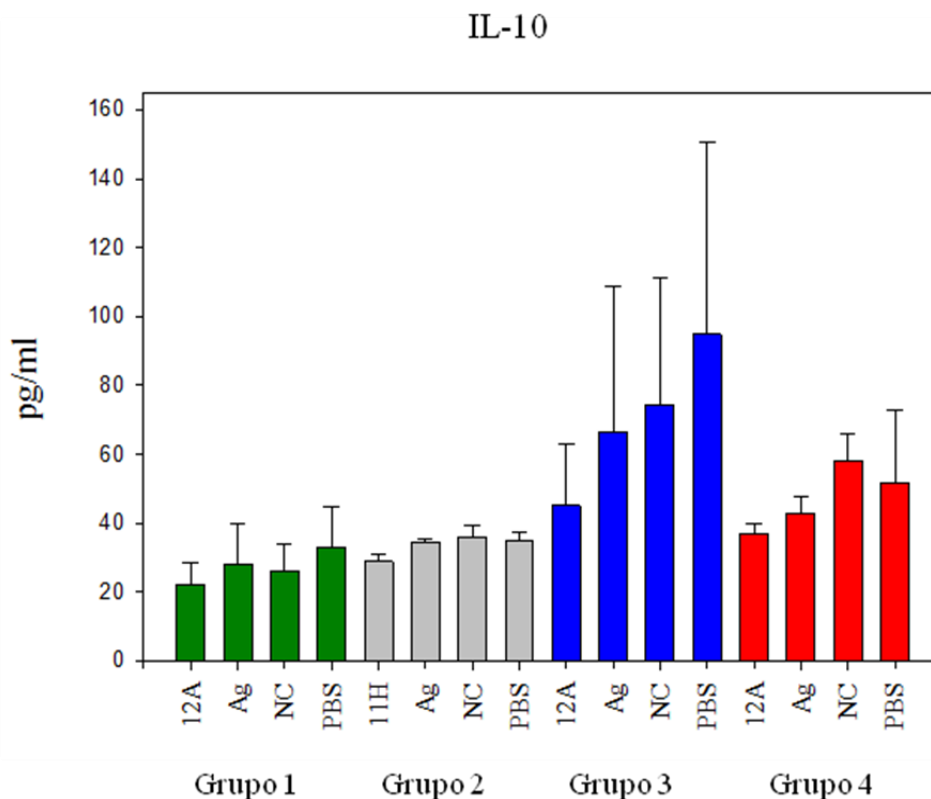
Com o intuito de avaliar o tipo de resposta imune induzida pela imunização de animais com os peptídeos sintéticos, foi avaliada a produção de citocinas (IFN-gama e IL-10) em cultura de esplenócitos de camundongos após o desafio experimental por *L. chagasi*.

Os gráficos das figuras 15 A e 15 B a seguir apresentam os dados obtidos referentes às citocinas anteriormente referidas.

A)



B)



**Fig.15- A) Produção de IFN- $\gamma$  por cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com peptídeos 12A (Grupo 1), 11H (Grupo 2), não-relacionado NC (Grupo 4) e antígeno de *L. chagasi* (Grupo 3).** Os grupos 1, 3 e 4 foram estimulados com, respectivamente, peptídeo 12A, Ag, NC e PBS (controle). O grupo 2 foi estimulado com peptídeo 11 H, Ag, NC e PBS, respectivamente. **B) Produção de IL-10 por cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com peptídeos 12A (Grupo 1), 11H (Grupo 2), não-relacionado NC (Grupo 4) e antígeno de *L. chagasi* (Grupo 3).** Todos os grupos foram submetidos aos mesmos estímulos utilizados no primeiro experimento (gráfico IFN- $\gamma$ ).

## **6- DISCUSSÃO**

As doenças não atendidas ou negligenciadas — infecciosas ou parasitárias — que afetam milhões de pessoas pobres na América Latina são uma manifestação evidente das desigualdades prevaletentes em saúde. Neste grupo podem ser incluídas as helmintíases intestinais, as esquistossomoses, a filariose linfática, a leptospirose, a leishmaniose, a cisticercose, a doença de Chagas e a malária. Todas afetam de maneira considerável as populações indígenas, os grupos étnicos minoritários, os residentes em zonas marginalizadas e rurais, e os trabalhadores migrantes. Em conjunto, o custo destas doenças em relação à produtividade dos trabalhadores e, portanto, ao desenvolvimento econômico dos países, é enorme. O aperfeiçoamento de métodos preventivos e diagnósticos constitui uma prioridade das políticas de saúde pública do Brasil.

A linha central de pesquisa desta tese visou a predição, seleção, síntese e utilização peptídeos, epitopos e/ou mimotopos, identificados pela técnica de Phage Display para desenvolver peptídeos ou imunógenos sintéticos a serem utilizados na produção de anticorpos vacinais na leishmaniose visceral murina.

As leishmanioses são doenças endêmicas em diversos países no mundo. Em sua grande maioria, são compostos por países apresentando as menores taxas de desenvolvimento mundial (Desjeux, 2004). Estima-se que cerca de 370 milhões de pessoas estejam expostas aos riscos de infecção e que 12 milhões sejam clinicamente afetadas pela doença.

Segundo levantamentos da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 1,5 a 2 milhões de novos casos de leishmanioses ocorrem a cada ano, dos quais cerca de 1 a 1,5 milhão correspondem a casos de Leishmaniose tegumentar, que corresponde à forma cutânea, mucocutânea e cutânea difusa da doença e cerca de 500.000 casos de Leishmaniose visceral (LV). Dessa forma, a Organização Mundial de Saúde classificou as leishmanioses como uma das principais doenças endêmicas que afetam especialmente os países em desenvolvimento (WHO, 2003).

A ocorrência da doença em uma dada área depende da presença do vetor e de reservatório/hospedeiro susceptível. A transmissão se dá a partir da picada de fêmeas infectadas de dípteros da espécie *Lutzomya Longipalpis*. Os cães domésticos constituem um

importante reservatório e são responsáveis pela natureza endêmica/epidêmica da doença (Silva *et al.*, 2001).

Neste trabalho, com o objetivo de se identificar novos antígenos, mais sensíveis e específicos, escolhemos uma nova estratégia de seleção, a técnica de *Phage Display*.

*Phage Display* consiste na expressão de milhares de peptídeos na superfície de bacteriófagos e que permite a seleção daqueles que apresentam maior especificidade individual a uma molécula alvo e, conseqüentemente, uma ligação de elevada afinidade (Smith, 1985).

Anticorpos IgG anti-*Leishmania chagasi* foram previamente purificados do soro de cães cuja infecção foi confirmada pelas técnicas de ELISA, RIFI e aspirado de medula e linfonodos. Após a obtenção, quantificação e caracterização, as imunoglobulinas anti-*L. chagasi* foram usadas para sensibilizar as placas para a bio-seleção (biopanning). Foram feitos três ciclos para que a afinidade de ligação dos fagos às imunoglobulinas aumentasse (Smith, 1985), uma vez os fagos selecionados no primeiro ciclo, são amplificados e utilizados no ciclo seguinte. No terceiro ciclo, a placa foi sensibilizada com uma quantidade cinco vezes menor de imunoglobulinas e conseqüentemente apenas os fagos que possuísem uma maior afinidade pelas moléculas alvo seriam selecionados e amplificados novamente.

Os clones considerados os mais reativos frente ao anticorpo específico foram testados frente a IgGs de soros de cães comprovadamente negativos, mas nenhum deles apresentou reatividade. Então, os mesmos foram avaliados frente a IgGs de cães portadores de Doença de Chagas, experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi*, para verificação da reatividades cruzada. Destes clones, apenas três apresentaram, simultaneamente, alta reatividade com anticorpo anti *L. chagasi* e baixa reatividade com anticorpo anti-*T. cruzi*.

Os três clones positivos (3B, 11H e 12A) reativos, apenas com anticorpos anti-*Leishmania chagasi* tiveram seus DNAs obtidos, analisados e seqüenciados. Com a seqüência de nucleotídeos foi determinada a estrutura primária de estes três peptídeos. Para verificar a existência de seqüências homólogas em proteínas de *L. chagasi* ou de outros organismos, foi realizada a análise em banco de dados (BLAST - Altschul *et al.*, 1990) que não encontrou homologia com nenhuma proteína descrita, sugerindo que estes peptídeos podem ser parte da estrutura de proteínas até o momento não descritas, ou tratar-se de epitopos conformacionais,

ou ainda serem mimotopos (peptídeos que mimetizam um epitopo sem ter a mesma estrutura primária).

De posse das seqüências de aminoácidos dos três peptídeos, previamente definidos, estes foram então sintetizados. O método da síntese química manual de peptídeo em fase sólida (método F-moc) foi utilizada e capaz de produzir peptídeos com alta pureza, determinada por HPLC (coluna de fase reversa, vydac-C4) e confirmada por espectrometria de massa, mostrando que o método utilizado para síntese foi eficiente. Outros peptídeos foram anteriormente sintetizados, seguindo esta mesma metodologia e utilizados para testes de imunodiagnóstico (Tsang *et al.*, 1989).

Como outra forma de se confirmar a reatividade dos peptídeos selecionados, com anticorpos anti-*L. chagasi*, foi empregada a técnica de *Spot-Synthesis* (Choulier *et al.*, 2001; Alvarenga *et al.*, 2002; Machado de Ávila *et al.*, 2004), uma das metodologias mais amplamente utilizadas para a identificação de epitopos. Esta etapa iniciou-se com a síntese paralela, sobre uma membrana de celulose, dos três peptídeos. Os anticorpos provenientes de cães portadores da leishmaniose reconheceram os peptídeos 11H e 12A e também confirmaram os resultados negativos do peptídeo 3B. Além disso, as IgGs de cães normais não reconheceram nenhum dos peptídeos sintéticos sobre a membrana.

Confirmada a reatividade de alguns peptídeos por Spot-ELISA com anticorpos de cães portadores de leishmaniose, estes foram individualmente utilizados em programas de imunização de camundongos pra se verificar o potencial imunoprotetor destes peptídeos. Como estratégia para aumentar a resposta imune de camundongos BALB/c contra peptídeos, estes foram individualmente interiorizados em lipossomos e veiculados com hidróxido de alumínio. Investigações anteriores demonstraram que vários fatores tais como a dose dos antígenos, rota de imunização e o uso de adjuvantes contribuem para uma indução preferencial de células para resposta celular do tipo Th1 ou resposta humoral do tipo Th2 (Abbas *et al.*, 1996).

Pelo fato da vacinação através do uso de imunógenos como proteínas purificadas ou peptídeos induzirem uma fraca resposta imunológica ou até mesmo tolerância, o uso de adjuvantes, são usualmente necessários para aumentar a eficácia da vacinação (Freund, 1956, Warren *et al.*, 1986). Ravindran *et al.* (2010) demonstraram que grupos de camundongos imunizados com antígeno de *L. donovani* e diferentes adjuvantes apresentaram resposta

significativa, entretanto, as maiores respostas foram observadas no grupo imunizado com vacina lipossomal.

Uma vez completado o programa de imunização, o nível de anticorpos anti-peptídeo nos diferentes grupos de imunização foi verificado através do método ELISA. Apenas no grupo de camundongos imunizados com o peptídeo 12A foi possível verificar anticorpos anti-peptídeo. Por outro lado, foi confirmada a existência de anticorpos anti-*L. chagasi* no grupo imunizado com antígeno bruto e não houve formação de anticorpos anti-peptídeo 11H e não relacionado, usado como controle negativo. Pode-se dizer que tais peptídeos não são imunogênicos, ou seja, não induzem uma resposta humoral.

Estudos em modelos murinos têm marcado diferenças biológicas entre as infecções por *L. major*, causadora da leishmaniose cutânea, e espécies causadoras da leishmaniose visceral. Mosmann & Coffman (1989) documentaram subtipos distintos de células T CD4+ incluindo as células Th1, que induziam ativação de macrófagos e células B produtoras de anticorpos IgG2a, e células Th2 indutoras da ativação de células B produtoras de anticorpos IgG1, IgA e IgE e a secreção de citocinas por essas células impedia o desenvolvimento de células Th1. Recentemente células T CD4+ secretoras de TGF- $\beta$  e IL-10 foram descritas e classificadas como subtipo Th3 (Wilson *et al.*, 2005).

Camundongos resistentes (C57BL/6 e C3H) desenvolvem o subtipo Th1 de resposta com células produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-2 durante a infecção por espécies causadoras de leishmaniose visceral. Assim como camundongos susceptíveis à infecção por *L. major*, há baixa produção de IFN- $\gamma$  por camundongos BALB/c infectados por *Leishmania sp* causadora de doença visceral (Melby *et al.*, 2001b, Wilson *et al.*, 1996). Apesar de semelhanças na indução de uma resposta imune protetora, mecanismos imunopatogênicos da leishmaniose visceral ainda não foram elucidados (Lehmann *et al.*, 2000).

Nosso resultado referente às dosagens de citocinas não se mostraram conclusivos, visto que não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de camundongos estudados. É possível que a proteção induzida pela imunização com os peptídeos sintéticos seja associada aos níveis não observados de anticorpos, uma vez que camundongos que responderam com títulos altos e baixos de anticorpos foram susceptíveis e resistentes, respectivamente, a infecção por *L. amazonensis* (Lima *et al.*, 1998).

A proteção induzida contra *L. chagasi* pela imunização com peptídeos sintéticos foi observada após 30 dias de infecção. Os resultados sugerem que o grupo imunizado com o peptídeo 11H apresenta um número menor de parasitas por mg de tecido. Embora os resultados não apresentem diferenças estatísticas significativas, acreditamos que o curto tempo de infecção e as variações no desvio padrão de cada grupo tenham sido determinantes nos resultados observados. Pensamos que um maior tempo de infecção será necessário para obter resultados estatisticamente significativos.

## **7- CONCLUSÕES**

- A técnica de Phage Display permitiu selecionar fagos expressando peptídeos com afinidade para anticorpos purificados de cães portadores de leishmaniose visceral.
- A técnica de Spot Síntese permitiu confirmar a reatividade de duas sequências peptídicas KCPSIPGAVLCV e ICARQDPAGNCS contra anticorpos anti-*L.chagasi*.
- As sequências peptídicas obtidas não apresentaram homologia estrutural com outras sequências presentes em Banco de dados da *Leishmania* ou de outros parasitas, sugerindo que estes peptídeos podem ser epitopos conformacionais ou mimotopos.
- A imunização com o peptídeo 12A incorporado em lipossomos foi capaz de induzir uma resposta de anticorpos.
- Não foi possível avaliar a resposta celular nos animais imunizados com peptídeos sintéticos.
- A imunização de camundongos com peptídeos sintéticos induziu uma resposta protetora contra a infecção experimental pelo *L. chagasi*, avaliada através da carga parasitária no baço dos animais.

## **8- PERSPECTIVAS**

- Repetir os ensaios de imunização com peptídeos sintéticos usando diferentes esquemas de imunização.
- Repetir os ensaios de imunoproteção com maiores tempos de infecção pelo *L. chagas*.
- Fazer ensaios de infecção in vitro de macrófagos utilizando diferentes quantidades de células.
- Imunolocalização no parasita de antígenos mimetizados pelos peptídeos sintéticos.
- Desenvolvimento e padronização de um teste de ELISA para LVC utilizando como antígenos os peptídeos sintéticos.

## **9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A. K., MURPHY, K. M. & SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383:787-93, 1996.

AFRIN, F.; ALI, N. Adjuvanticity and protective immunity elicited by **Leishmania donovani** antigens encapsulated in positively charged liposomes. *Infect Immunology*, 65(6)2371-7, 1997.

ALENCAR, J.E. Calazar canino: contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil. Tese, Imprensa Oficial. 342p. 1959.

ALEXANDER, J. ; SATOSKAR, A. R. ; RUSSEL, D. G. **Leishmania** species: models of intracellular parasitism. *Journal Cell Science*, 112 :2993-3002, 1999.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal Mol Biol.* Oct 5;215(3):403-10, 1990.

ALVAR, J.A.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZALEZ, F.; SAN ANDRES, M.D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F. Canine Leishmaniasis : clinical parasitological and entomological follow up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.88, n.0, p.1-8, Liverpool, 1994.

ALVARENGA, L.M.; GRANIER, C.; DINIZ, C.R.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Induction of neutralizing antibodies against **Tityus serrulatus** scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes. *Toxicon*. v.40, p.89-95, 2002.

ALVES, W.A.; BEVILCQUA, P.D. Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997 *Caderno de Saude Publica*,20:259-65, 2004.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M.A. Distributions and relationships between clinical and histopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, v.18, [s.n], p.147-156, 2003.

ARMIJOS, R. X.; WEIGEL, M. M.; AVILES, H.; MALDONADO, R.; RACINES, J. Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. *Journal of Infect Diseases*, May;177(5):1352-7, 1998.

ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER, R.H. Comparison of the Polymerase Chain Reaction and Serology for the detection of canine leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.58, n.8, p.251-255, 1995.

AYALI, D.S.; BANETH, G. Canine Visceral Leishmaniasis, sep, 2001. Disponível em <[www.ivis.org](http://www.ivis.org)>

BEYRODT, C.G.; PINTO, A.R.; FREYMÜLLER, E.; BARBIÉRI, C.L. Characterization of an antigen from **Leishmania amazonensis** amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. *Infect. Immun.*,65:2052-9, 1997.

BLACKWELL, J.M. Leishmaniasis Epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology*, 104 (suppl.): p.19-34, 1992.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORE, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniasis. *The Veterinary Journal*, v.162, [s.n.], p.108-120, 2001.

BRADFORD, M. An rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.73, p.248-254, 1972.

BRUNET, L.R. Nitric oxide in parasitic infections. *Intern. Immunoph.*, 1:1457-1467, 2001.

BUTTON, L. L.; McMASTER, W. R. Molecular cloning of the major surface antigen of *Leishmania*. *Journal of Exp. Medicine*, 167:724-29. 1988.

CARDOSO, L. & CABRAL, M. **Leishmania** and canine leishmaniasis. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinária*, v.93, n.527, p.122-141, 1998.

CARVALHO, F. A. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A. P.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E.P.; RABELLO, A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A.P. Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant **Leishmania donovani** A2 antigen. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 43:289-95, 2002.

CHANG, K. P.; REED, S. G.; MCGWIRE, B. S.; SOONG, L. **Leishmania** model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Tropica*, 85:375-390, 2003.

CHOULIER, L.; LAUNE, D.; ORFANOUDAKIS, G.; WLAD, H.; JANSON, J.C.; GRANIER, C.; ALTSCHUH, D. Delineation of a linear epitope by multiple peptide synthesis and phage display. *Journal of Immunological Methods*. v.249, p.253-264, 2001.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by **Leishmania infantum**. *The veterinary Records*, v.141, [s.n], p.539-543, 1997.

CUNHA, A. M. Infecções experimentais na Leishmaniose Visceral Americana. *Brasil Médico*, v.25, 571p, 1938.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULÁLIO, C.; CRISTOVÃO, J.; NETTO, E.; JOHNSON, W. D.; REED, S. G.; BADARÓ, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.*, 89:155-58, 1995.

DEANE, L.M. & DEANE, M.P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*, v.47, p.75-87, 1955<sup>b</sup>.

DE LUCA, P. M., MAYRINK, W., ALVES, C. R., COUTINHO, S. G., OLIVEIRA, M. P., BERTHO, A. L.. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*, 17, 1179-85, 1999.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *Wld. Hlth. Statist. Quart.*, 45:267-275, 1992.

DESJEUX, P. *Leishmaniasis*. Public health aspects and control. *Clinical Dermatology*, 14(5): 417-23, 1996.

DESJEUX, P. *Leishmaniasis*. *Nat. Rev. Microbiology*, 2(9):692, 2004.

DOMINGUEZ, M. & TORAÑO, A. A immune adherence mediated opsonophagocytosis: the mechanism of **Leishmania** infection. *Journal Experimental Medicine*, v.189, n.1, p.25-35, 1999.

FERNANDES, A.P.; HERRERA, E. C.; MAYRINK, W.; GAZZINELLI, R. T.; LIU, W. Y.; COSTA, C.A.; TAVARES, C. A.P.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; GENTZ, R.; NASCIMENTO, E. Immune responses induced by a **Leishmania Leishmania**

**amazonensis** recombinant antigen in mice and lymphocytes from vaccinated subjects. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39:70-78, 1997.

FERNANDES, A.P.; COSTA, M. M.; COELHO, E. A.; MICHALICK, M. S.; DEFREITAS, E. Protective immunity against challenge with **Leishmania (Leishmania) chagasi** in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26:5888–5895, 2008.

FERRER, L. Leishmaniasis canina en España: datos para el clínico. *Enferm Infecc. Microbiology Clinic*, v.7, p. 293-295, 1989.

FERRER, L. Leishmaniasis : update in diagnosis and therapy. *Proceedings of European Society of Veterinary Dermatology*, PISA, 1997.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: Moving towards a Solution, 2002, Sevilha. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*. Sumène,: [s.ed.], p.21-24, 2002.

FISA, R.; RIERA, C.; GALLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M . Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, v.99 [s.n.], p.105-111, 2001.

FRAGAKI, K.; SUFFIA, I.; FERRUA, B.; ROUSSEAU, D.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. Immunization with DNA encoding **Leishmania infantum** protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine*, 19:1701-09, 2001.

FREUND, J. The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibl Tuberc.*, 130-48, 1956.

FUJIWARA, R. T.; VALE, A. M.; DA SILVA, J. C. F.; DA COSTA, R. T.; QUETZ, J. S.; FILHO, O. A. M.; REIS, A. B.; OLIVEIRA, R. C.; MACHADO-COELHO, G. L.; BUENO, L. L.; BETHONY, J. M.; FRANK, G.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.;

MAYRINK, W.; REED, S.; CAMPOS-NETO, A. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research*,36:827-38, 2005.

GENARO, O. Leishmaniose Visceral Canina Experimental. 1993. 202p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GENARO, O.; Mayrink,W.; Michalick, M.S.M.; Dias, M.; Costa, C.A.; Melo, M.N. Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.83, p.43, 1988.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S.J.; MASON, T.J.; A priori delineation of a peptide witch mimics a discontinuous antigenic determinant. *Molecular Immunology*, v.23, p.709-715, 1986.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American. Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41:687-725, 1989.

GRIMALDI Jr, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*, v.6, n.2, p.230-250, 1993.

GUIMARÃES, T.M.P.D.; TOLEDO, V.P.C.P.; COSTA, C.A.; DA COSTA, R.T.; GENARO, O.; WILLIAMS, P.; MAYRINK, W. Assessment of immunity induced in mice by glicoproteins derived from different strains and species of **Leishmania**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:63-70, 1996.

HALL, B. F.; JOINER, K. A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. *Immunology Today*,12:A22-A27, 1991.

HARLOW, E.; LANE, D. (1988) Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

HUNT, A.R.; FREDERIKSON, S.; HINKEL, C.; BOWDISH, K.S.; ROHRIG, J.T. A humanized murine monoclonal antibody protects mice either before or after challenge with virulent Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J. Gen. Virol.*, v. 87, p. 2467-2476, 2006.

JACKSON, D.; CHUA, B.Y.; ZENG, W. Totally synthetic peptide-based vaccines that target dendritic cells and induce potent antibody or CTL response. *Intern. Congr. Series*, 1289:311-315, 2006.

JERONIMO, S. M.; OLIVEIRA, R. M.; MACKAY, S.; COSTA, R. M.; SWEET, J. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R. Soc. Trop Med Hyg* 88:386–388, 2004.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sandfly saliva and its role in the establishment of **Leishmania** infections. *Microbes and Infection*, 2:1765-73, 2000.

KAUR, S.; KAUR, T.; GARG, N.; MUKHERJEE, M.; RAINA, P.; ATHOKPAM, V. Effect of dose and route of inoculation on the generation of CD4+ Th1/Th2 type of immune response in murine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 103:1413–1419, 2008.

KAYE, P. M.; CURRY, A.J.; BLACKWELL, J.M. Differential production of Th1 and Th2-derived cytokines does not determine genetically controlled vaccine induced rate of cure in murine visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 146: 2763–2770, 1991.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine

visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.35, n.5, p.376-383, 1999.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100:811–827, 2005.

LAUNE, D.; MOLINA, F.; FERRIERES, G.; VILLARD, S.; RIEUNIER, F.; CHARDES, T.; GRANIER, C. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunology Methods*, 1;267(1):53-70, 2002.

LAUNOIS, P.; SWIHART, K.; CONCEICAO-SILVA, F.; MILON, G.; LOUIS, J. A T-cell response elicited by *Leishmania major* in mice. In: *Molecular and Immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis*. Eds. Tapia, F.J.; Caceres-Dittmar, G. & Sanches, M.A., 4032-4039, 1996.

LAUNOIS, P.; GUMY, A.; HIMMELRICH, H.; LOCKSLEY, R.M.; ROCKEN, M.; LOUIS, J.A. Rapid IL-4 production by **Leishmania** homolog of mammalian RACK1-reactive CD4<sup>+</sup> T-cells in resistance mice treated once with anti-IL-12R or IFN- $\gamma$  antibodies at the onset of infection with **Leishmania major** instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions. *J. Immunol.*, 168:4628-4635, 2002.

LEHMANN, J., ENSSLE, K. H., LEHMANN, I., EMMENDORFER, A. & LOHMANN-MATTHES, M. L. The capacity to produce IFN-gamma rather than the presence of interleukin-4 determines the resistance and the degree of susceptibility to **Leishmania donovani** infection in mice. *J Interferon Cytokine Res*, 20, 63-77, 2000.

LESTOQUARD, F. & DONATIEN, A. Parasitisme de la matrice unguéale dans la leishmaniose générale du chien. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.31, [s.n.], p. 483-487, 1938 apud Genaro, O. *Leishmaniose Visceral Canina Experimental* Belo Horizonte: Instituto de

Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1993, 146p. (Tese, Doutorado em Parasitologia).

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of **Leishmania major** through the induction of nitric oxide. *Journal Immunology*, 145(12)4306-10, 1990.

LIMA, H. C. & TITUS, R. G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun*, 64, 5442-5, 1996.

LIMA, V. M.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.; FEITOSA, M.M.; Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.36, n.4, p.485-489, 2003.

LINDEMBERG, A.A. Glycoprotein conjugate vaccines. *Vaccine*, 17:28-36, 1999.

MACHADO DE AVILA, R.A. ; ALVARENGA, L.M. ; TAVARES, C.A. ; MOLINA, F. ; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by **Tityus serrulatus** scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. *Toxicon*, v.44, p.233-241, 2004

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. P.; LEAL, C. A, MARZOCHI, M. C. A. Identification of **Leishmania chagasi** isolated from healthy skin symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 8:440-444, 2004.

MADEIRA, M. F., SCHUBACH, A. O., SCHUBACH, T. M., PACHECO, R. S., OLIVEIRA, F. S., PEREIRA, S. A., FIGUEIREDO, F. B., BAPTISTA, C., MARZOCHI, M. C. Mixed infection with **Leishmania (Viannia) braziliensis** and **Leishmania**

**(Leishmania) chagasi** in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100:442-445, 2006.

MANCIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parasitologia*, v.31, n.2-3, p.213-230, 1989.

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme linked immunosorbent assay (DOT- ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescent assay. *Veterinary Parasitology*, v.65, [s.n.], p.1-9, 1998.

MANOUTCHARIAN, K.; SOTELO, J.; GARCIA, E.; CANO, A.; GEVORKIAN, G. Characterization of Cerebrospinal fluid Antibodies Specificities in Neurocysticercosis Using Phage Display Peptide Library. *Clinical Immunology*, v.91, n.1, p.117-121, 1999.

MARGARITO, J.M.; LUCENA, R.; LOPEZ, R.; MOLLEDA, J.M.; MARTIN, E.; GINEL, P.J. Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with leishmaniasis. *Zent. Vet.* V.45, n.5, p.263-267, 1998.

MARTY, P.; LE FICHOUX, Y.; GIORDANA, D.; BRUGNETTI, A. Leishmanin reaction in the human population of a highly endemic focus of canine leishmaniosis in Alpes-Maritimes, France. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.86, p.249-250, 1992.

MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.D.A.S.; SABROZA, P.C.; DE SOUZA, M.A.; RANGEL JUNIOR, F.B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.80, n.3, p.349-357, 1985.

MARZOCHI, M.C.; Marzochi, K.B.; Carvalho, R.W. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitology Today*, v.10, [s.n.], p.34-37, 1994.

MARZOCHI, K. B.; MARZOCHI, M. A.; SILVA, A. F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E. M.; MODABBER, F. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Mar-Apr;93(2):205-12, 1998.

MAYRINK, W.; GENARO, O.; SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; TAFURI, W. L.; TOLEDO, V. P.; DA SILVA, A. R.; REIS, A. B.; WILLIAMS, P.; DA COSTA, P. W. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91(6):695-7, 1996.

MELBY, P. C., TABARES, A., RESTREPO, B. I., CARDONA, A. E., MCGUFF, H. S. & TEALE, J. M. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol*, 99, 17-25, 2001b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde (ed). Brasília. 2006

MOLINA, F.; LAUNE, D.; GOLGAT, C.; PAU, B.; GRANIER, C. Improved performances of Spot multiple peptide synthesis. *Journal of Peptide Research*, v.9, p.151-155, 1996.

MONTEIRO, S.P.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.27, p. 67-72, 1994.

MORENO, J. & ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, v.18, n.9, p.399-405, 2002.

MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, **7**, 145-73,1989.

MOSSER, D.M. & ROSENTHAL, L.A. **Leishmania** macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Cell Biology*, v.4, [s.n], p.315-322, 1993.

NELSON, R.W. & COUTO, C.G. Doenças protozoárias polissistêmicas. In : NELSON et al. *Medicina interna dos pequenos animais*. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, Cap. 104, p.1031-1038, 2001.

NIETO C.G., GARCÍA-ALONSO M., REQUENA J.M., MIRÓN C., SOTO M., ALONSO C., NAVARRETE I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of **Leishmania infantum**: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **67**:117–130, 1999.

NOYA, O.; PATARROYO, M.E.; GUZMAN, F.; ALARCON DE NOYA, B.; Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. *Current Protein and Peptide Science*, v.4, p.299-308, 2003.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M.; PAULA, H. N.; PERRI, S. H.; ANDRADE, A. M.; DIAS, F. E. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol.*; **153**:19-23, 2008.

OLIVEIRA, A. L. ; PANIAGO, A. M. ; DORVAL, M. E. ; OSHIRO, E. T. ; LEAL, C. R. Emergent outbreak of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State. *Rev Soc Bras Med Trop.*, **39**:446–450, 2006.

OLIVEIRA DA SILVA, V. ; BORJA-CABRERA, G. P. ; PONTES, N. N. C. ; SOUZA, E. P. ; LUZ, K. G. ; PALATNIK, M. ; SOUZA, C. B. P. A phase III trial of efficacy of the

FML-vaccine against canine kalazar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, 19 :1082-1092, 2001.

PADOA, C.J. & CROWTHER, N.J. Engineered antibodies: a new tool for use in diabetes research. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, v. 74, p. S51-S62, 2006

PARRA, L.E.; BORJA-CABRERA, G. P.; SANTOS, F. N.; SOUZA, L.O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C.B. Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Vaccine* 25:2180–2186, 2007.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y.D.; FUCHS, M.; OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of **Leishmania mexicana** amastigotes. *Journal of Cell Science*, v.108, [s.n.], p.3715-3724, 1995.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: **Leishmania** and regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 213:159-179, 2006

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**. *Infection and Immunity*, p. 229-235, 1994.

PORTEFAIX, J.M.; FANUTTI, C.; GRANIER, C.; CRAPEZ, E.; PERHAM, R.; GRENIER, J.; PAU, B.; DEL RIO, M. Detection of anti-p53 antibodies by ELISA using p53 synthetic or phage-displayed peptides. *J. Immunol. Methods*, v. 259, p. 65-75, 2002.

POSNER, R.G.; FAY, S.P.; DOMALEWSKI, M.D.; SKLAR, L.A.; Continuous spectrofluorometric analysis of formyl peptide receptor ternary complex interactions. *Mollecular Pharmacology*, v.45, n.1, p.65-73, 1994.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, v.122, [s.n.], p.253-261, 2001.

RAFATI, S.; SALMANIAN, A.H.; TAHERI, T.; VAFA, M.; FASEL, N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of **Leishmania major**. *Vaccine*, 19:3369-3375, 2001.

RAVINDRAN, R.; BHOWMICK, S.; DAS, A.; ALI, N. Comparison of BCG, MPL and cationic liposome adjuvant systems in leishmanial antigen vaccine formulations against murine visceral leishmaniasis. *BMC Microbiology*, 10:181, 2010.

REED, S.G.; CAMPOS-NETO, A. Vaccines for parasitic and bacterial diseases. *Curr. Opin. Immunol.*, 15:456-460, 2003.

REIS, A.B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com **Leishmania (Leishmania) chagasi**, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. 2001. 180p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMAO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by **Leishmania infantum**. *Veterinary Immunology and Pathology*, v.88, [s.n.], p.21-30, 2002.

SCOTT, J.K.; SMITH, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, v.249, p.386-390, 1990.

SCOTT, P. ; PEARCE, E. ; NATOVITZ, P. ; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. *Journal Immunology*, 139 :221-227, 1987.

SCOTT, P. ; PEARCE, E. ; CHEEVER, A. W. ; COFFMAN, R.L. ; SHER, A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Rev.*, 112:161-82, 1989.

SERGEEVA, A.; KOLONIN, M.G.; MOLLDREM, J.J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 58, p. 1622-1654, 2006.

SHAPIRA, M.; PINELLI, E. Heat shock protein 83 of **Leishmania mexicana amazonensis** is an abundant cytoplasmatic protein with a tandemly repeated genomic arrangement. *European Journal of Biochemistry*, 185:231-236, 1989.

SHEPPARD, H. W.; SCOTT, P. A.; DWYER, D. M. Recognition of *Leishmania donovani* antigens by murine T lymphocyte lines and clones. Species cross-reactivity, functional correlates of cell-mediated immunity, and antigen characterization. *Journal Immunology*, 131(3)1496-503, 1983.

SHER, A.; COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 10:385-409. (1992).

SIDHU, S.S.; LOWMAN, H.B.; CUNNINGHAM, B.C.; WELLS, J.A. Phage Display for selection of novel bindings peptides. *Methods in Enzymology*. v.63, p. 328-333, 2000.

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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.3, p.285-291, 2001.

SJOLANDER, A.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J. M.; HANDMAN, E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 160:3949-3957, 1998.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, v.228, p.1315-1317, 1985.

SOLANO-GALEGO, L.; FERNANDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. Histological and Immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* infected dogs. *Journal Comparative Pathology*, v.130, [s.n.], p.7-12, 2004.

STAGER, S.; SMITH, D. F.; KAYE, P. M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from ***Leishmania donovani*** induces protection against visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology*, 165:7064-7071, 2000.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol. Cell Biol.*, 85(2):138-47, 2007.

TAN, G.H.; YUSOFF, K.; SEOW, H.F.; TAN, W.S. A phage-displayed single chain variable fragment that interacts with hepatitis B core antigen: library construction, selection and diagnosis. *J. Clin. Virol.*, v. 38, p. 49-56, 2007.

TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review Molecular Diagnosis*, v.3, n.5, p.657-667, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.*, 22:4673-4680, 1994.

TSANG, C. W. ; CHAN, S. F. ; LEE, P. P.; PANG, S. F. Mass spectrometric identification and quantification of 5-methoxytryptophol in quail retina. *Biochem Biophys Res Commun*, 29;165(3):1331-6, 1989.

VALLADARES, J.E.; FREIXAS, J.; ALBEROLA, J.; FRANQUELO, C.; CRISTOFOL, C.; ARBOIX, M. Pharmacokinetics of liposome-encapsulated meglumine antimoniate after intramuscular and subcutaneous administration in dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.57, n.4, p.403-406, 1997.

VAN DER BURG, S. H.; BJIKER, M. S.; WELTERS, M. J. P.; OFFRINGA, R.; MELIEF, C. J. M. Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 43:118-126, 2006.

VAN DER VEEN, R. C.; DIETLIN, T.A.; PEN, L.; GRAY, J.D.; HOFMAN, F.M. Antigen presentation to Th1 but not Th2 cells by macrophages results in nitric oxide production and inhibition of t cell proliferation: interferon- $\gamma$  is essential but insufficient. *Cellular Immunology*, 206:125-135, 2000.

WARREN, H. S., VOGEL, F. R. & CHEDID, L. A. Current status of immunological adjuvants. *Annu Rev Immunol*, 4, 369-88, 1986.

WILSON, M. E., SANDOR, M., BLUM, A. M., YOUNG, B. M., METWALI, A., ELLIOTT, D. Local suppression of IFN-gamma in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. *J Immunol*, 156, 2231-9, 1996.

WILSON, M. E., JERONIMO, S. M. & PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog*, 38, 147-60, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of canine leishmaniasis. Technical Reports Series. World Health Organization, Geneva, n.793, p.106, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. CTD internal document, the Leishmaniasis, meeting of interested parties on management and financing of the control of tropical diseases other than malaria, by Dr. P. Desjeux, Geneva, CTD/MIP/WP.93.8, 15 September 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The disease and its impact. World Health Organization. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>. 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. TDR diseases/Diseases current portfolio <http://www.who.int/tdr/diseases/default.html>. 2003.

YU, J.; SMITH, G.P. Affinity maturation of phage-displayed peptide ligands. *Methods in Enzymology*, v.267, p.3-27, 1996.