

Universidade Federal de Minas Gerais

**USO DE PEPTÍDEO SINTÉTICO SELECIONADO POR
PHAGE DISPLAY PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Christina Monerat Toledo Machado

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtégui

**Belo Horizonte
Agosto de 2005**

CHRISTINA MONERAT TOLEDO MACHADO

**USO DE PEPTÍDEO SINTÉTICO SELECIONADO POR
PHAGE DISPLAY PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Dissertação 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 obtenção do título de Mestre em Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Área de concentração: Biologia Molecular – Imunologia.

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

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2005

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 2.1- O agente etiológico e morfologia..... | 16 |
| 2.2- Ciclo Biológico e transmissão..... | 16 |
| 2.3- Epidemiologia..... | 17 |
| 2.4- Patogenia da LVC..... | 18 |
| 2.5- Imunodiagnóstico canino..... | 20 |
| 2.6- A técnica de Phage Display: Expressão de peptídeos na superfície de fagos..... | 23 |
| 2.7- Síntese de peptídeos em membrana de celulose. Método se Spot- Síntese..... | 25 |
| 3. OBJETIVOS..... | 27 |
| 3.1- Objetivo Geral..... | 27 |
| 3.2- Objetivos específicos..... | 27 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 28 |
| 4.1- Soros dos cães..... | 28 |
| 4.2- Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) do tipo Indireto para Leishmaniose Visceral Canina..... | 28 |
| 4.2.1- Obtenção do antígeno solúvel de Leishmania chagasi..... | 28 |
| 4.2.2- Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford..... | 29 |
| 4.2.3- Produção do conjugado IgG de carneiro anti-IgG de cão ligado a Peroxidase..... | 29 |
| 4.2.4- Elisa dos soros de cães positivos e negativos..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3- Extração e purificação de imunoglobulinas anti- <i>L.chagasi</i> e normais pára seleção de fagos específicos..... | 30 |
| 4.4- Teste de ELISA para verificação da reatividade da IgGs purificadas..... | 31 |
| 4.5- Técnica de Phage Display..... | 32 |
| 4.5.1-Seleção de peptídeos expressos na superfície dos fagos (Biopanning)..... | 32 |
| 4.5.2-ELISA para testar a reatividade dos fagos nos três ciclos de seleção..... | 34 |
| 4.5.3- Screening de antígenos selecionados..... | 34 |
| 4.5.4- Teste de reação cruzada dos clones positivos..... | 35 |
| 4.5.5- Subclonagem dos clones positivos..... | 35 |
| 4.6- Seqüenciamento de DNA viral..... | 36 |
| 4.6.1- Extração do DNA..... | 36 |
| 4.6.2- Dosagem do DNA..... | 36 |
| 4.6.3- Sequenciamento automático capilar..... | 36 |
| 4.7- Identificação e análise de homologia dos peptídeos selecionados..... | 36 |
| 4.8- Ensaio sorológicos com fagos | 37 |
| 4.8.1- Preparação dos fagos..... | 37 |
| 4.8.2- Ensaio de ELISA usando fagos totais como antígenos..... | 37 |
| 4.9- Síntese química manual do peptídeo em fase sólida – Método F-moc..... | 38 |
| 4.10- Purificação do peptídeo sintético..... | 39 |
| 4.11- Ligação do peptídeo ao BSA..... | 40 |
| 4.12- Polimerização do peptídeo com glutaraldeído..... | 40 |
| 4.13- ELISA utilizando peptídeos sintéticos..... | 40 |
| 4.14- Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana..... | 40 |
| 5.RESULTADOS..... | 42 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1- Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) do tipo Indireto para Leishmaniose Canina..... | 42 |
| 5.2- Reatividade das imunoglobulinas purificadas frente ao antígeno de <i>L.chagasi</i> | 43 |
| 5.3- Reatividade dos fagos após três ciclos de seleção..... | 44 |
| 5.4- Seleção dos fagos de interesse (Screening)..... | 45 |
| 5.5- Especificidade dos clones positivos frente à IgGs normais..... | 47 |
| 5.6- Especificidade dos clones positivos frente à IgGs de cão anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> | 48 |
| 5.7- Seqüenciamento dos clones positivos..... | 50 |
| 5.8- Desenvolvimento do ELISA com fagos ligados na placa | 50 |
| 5.9- Purificação do peptídeo..... | 51 |
| 5.10- Espectrometria de massa..... | 53 |
| 5.11- Imunoensaios com o peptídeo sintético..... | 53 |
| 5.12- Imunoensaios com peptídeos ligados à membrana..... | 54 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 56 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 62 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 63 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 64 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Reatividade dos soros de cães frente ao antígeno de <i>Leishmania chagasi</i> | 42 |
| Figura 2. Reatividade das imunoglobulinas purificadas..... | 44 |
| Figura 3. Reatividade dos fagos após Pannings 1, 2 e 3..... | 45 |
| Figura 4. Reatividade após o terceiro ciclo de seleção (P3) frente a Igs purificadas | 46 |
| Figura 5. Reatividade dos clones positivos frente a IgG normal de cão..... | 47 |
| Figura 6. Reatividade dos clones selecionados frente a imunoglobulina de cão anti T. cruzi.... | 49 |
| Figura 7. Reatividade dos fagos com soros de cães positivos e normais..... | 50 |
| Figura 8. Perfil de eluição do peptídeo sintético em coluna de fase reversa C18 em sistema de HPLC..... | 52 |
| Figura 9. Análise por espectrometria de massa do pico purificado com massa estimada de 1886 Da (Dalton)..... | 53 |
| Figura 10. Análise da reatividade dos peptídeos sobre a membrana com pool de soros positivo e negativo..... | 54 |

RESUMO

Neste trabalho foram selecionados três antígenos através da técnica de Phage Display para o imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Estes antígenos tiveram os DNAs extraídos e seqüenciados. O clone que apresentou a maior reatividade frente ao pool de soros de cães com leishmaniose visceral foi sintetizado através da síntese química em membrana de celulose e na sua forma solúvel, purificado e sua massa confirmada através de espectrometria de massa. Este peptídeo (TTDDDKLKKTLTYRS) foi avaliado em ensaios de ELISA do tipo indireto e em ensaios de Spot frente a soros de cães positivos e normais para leishmaniose visceral canina. Não se detectou reatividade imunoenzimática dos soros avaliados frente a este peptídeo sintético. Outros dois peptídeos selecionados também foram sintetizados em membranas de celulose e avaliados. Estes peptídeos foram capazes de serem reconhecidos apenas por soros de animais positivos para leishmaniose visceral. A possibilidade de estes peptídeos serem usados em ensaios de ELISA como kits de diagnóstico para leishmaniose visceral canina será verificada após a síntese solúvel destes.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são infecções parasitárias amplamente distribuídas pelo mundo e caracterizam-se pela infecção de fagócitos mononucleares por protozoários do gênero *Leishmania*. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima uma incidência global anual de 500 mil casos. Em todo o mundo, a Leishmaniose Visceral (LV) é considerada uma das doenças parasitárias mais importantes e emergentes (Tesh, 1995).

Na América Latina, a LV, também conhecida como calazar, tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Laison & Shaw, 1987) e é transmitida pela picada das fêmeas infectadas do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como “mosquito – palha”.

As manifestações da LV em humanos 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).

Os reservatórios da doença estão limitados a um grupo específico da família Canidae, sobretudo cães e raposas, podendo ainda envolver outros animais como reservatórios secundários, como os marsupiais (Cabrera *et al.*, 2003). O cão é o mais importante reservatório quando se considera a forma zoonótica da doença (Moreno & Alvar, 2002). Este animal é responsável pela manutenção do parasita nos focos endêmicos e, conseqüentemente, é considerado um alvo estratégico no controle da enfermidade. Recentemente, foi notificado um caso de LV felina em gato doméstico (*Felis catus*) em uma área não-endêmica (Savani *et al.*, 2004), entretanto, o papel do gato como reservatório da doença ainda não foi completamente esclarecido.

No Brasil, a LV, antes de ocorrência restrita a áreas rurais ou peri-urbanas, encontra-se hoje em plena expansão e urbanização nas cidades de grande e médio porte, tornando-se assim, preocupação para os órgãos de Saúde Pública (Silva *et al.*, 2001).

Desde o ano de 1992, a região Metropolitana de Belo Horizonte tem sofrido expansão da LV (Michalick, 1992) com crescente número de casos humanos e caninos. A proximidade entre as habitações, a alta densidade populacional, a grande

susceptibilidade da população à infecção e o grande número de cães infectados têm contribuído para a rápida expansão dessa enfermidade no ambiente urbano.

Apesar da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) ser um processo patológico amplamente estudado, ainda não se obteve êxito no campo da terapêutica. Não existe uma droga específica contra a doença no cão, por isso o tratamento dos animais infectados vem sendo realizado com os mesmos fármacos utilizados para o tratamento humano. Porém, esse tratamento não é capaz de curar totalmente o cão. Há apenas uma diminuição de sua capacidade infectante para o inseto, mas ele, o cão, continua sendo um reservatório da doença (Gradoni *et al.*, 1987 e Guarga *et al.*, 2000).

Nos cães, a apresentação clínica da LV é conseqüência de interações complexas entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro (Santos-Gomes *et al.*, 2002). Assim sendo, os cães, assim como os humanos, apresentam sintomatologia clínica variada, que vai desde aparente estado sadio, até grave estado terminal (Ciaramella *et al.*, 1997). Entretanto, a maioria das infecções são assintomáticas (Badaró *et al.*, 1996 e Marty *et al.*, 1992)

Tal diversidade de sintomas clínicos e o grande número de animais infectados e assintomáticos, tornam o diagnóstico clínico da LVC uma tarefa difícil, o que faz com que os exames complementares sejam de fundamental importância (Ferrer *et al.*, 1995; Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999 e Blavier *et al.*, 2001).

Atualmente, os métodos diagnósticos utilizados apresentam sensibilidade e especificidade que 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. A especificidade dos testes sorológicos também é comprometida quando são utilizados em áreas em que o cão sofre de Leishmaniose Tegumentar ou Doença de Chagas, pois se observa elevada reação cruzada nestes testes (Ferrer *et al.*, 1995 e Mancianti, Pedonese & Poli, 1996). Todos esses fatores acarretam taxas de infecções subestimadas e, conseqüentemente permitem a manutenção de animais infectados nas áreas endêmicas.

O diagnóstico parasitológico realizado em cães, através da punção de líquidos de medula óssea e linfonodos, é também muito utilizado, mas causa grande sofrimento ao animal por ser um método invasivo e muito rústico. 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).

Os métodos diagnósticos para LV canina, principalmente em áreas endêmicas, são ainda insuficientes e inadequados ao quadro de expansão da doença (Fisa *et al.*, 2001), o que justifica a pesquisa para obtenção de kits padronizados e busca por novos e melhores antígenos.

A expressão de peptídeos na superfície de fagos, Phage Display, apresenta uma nova perspectiva na busca de novos antígenos para o imunodiagnóstico de várias doenças. É uma técnica que pode ser muito útil no diagnóstico, principalmente no que se refere à especificidade do teste. Esta técnica permite a seleção de peptídeos que são expressos na superfície de fagos filamentosos, através da especificidade individual a uma molécula alvo e de uma ligação de alta afinidade. (Yu & Smith, 1996).

Essa estratégia tem se mostrado mais eficiente do que outras técnicas devido aos resultados de sucesso na pesquisa clínica e biomédica (Santamaria, 2003).

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 molécula alvo e ligante Assim, é possível selecionar epitopos ou mimotopos com potencial para serem usados como antígenos em imunodiagnóstico, utilizando-se, neste caso, soros de cães comprovadamente infectados com *L. chagasi* como fonte de seleção para os fagos de interesse.

Classicamente, os testes sorológicos para detecção de anticorpos são baseados no uso de antígenos brutos e purificados. Diante dos problemas tais como reações cruzadas e baixa sensibilidade utilizando-se estes antígenos, os peptídeos sintéticos abriram novo campo e perspectivas para o diagnóstico de várias parasitoses, baseados na detecção de anticorpos e antígenos circulantes. A imitação química de antígenos oferece várias possibilidades para o diagnóstico de infecções num contexto mundial, já que esta estratégia é menos onerosa, mais simples e útil para testes em larga escala e, na maioria dos casos, mais específica e sensível, adequando-se perfeitamente a condição atual dos países em desenvolvimento que sofrem inúmeras enfermidades (Noya *et al.*, 2003).

Juntamente com o *Phage Display*, a técnica de Síntese química de múltiplos peptídeos em membranas de celulose (*Spot Synthesis*) representa uma metodologia complementar e alternativa para a identificação de muitos epitopos e mimotopos (Hohne *et al.*, 1993; Ferrieres *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Ela permite a localização da região ligante (epitopo selecionado por *Phage Display*) e a identificação de resíduos essenciais para esse reconhecimento (Choulier *et al.*, 2001). Um grande número de peptídeos pode ser sintetizado e testado simultaneamente para identificar e caracterizar os sítios de ligação de interesse.

Os resultados da combinação das técnicas de Phage Display, Síntese química solúvel de peptídeos e Spot Synthesis poderão ser de grande utilidade no que diz respeito a implantação de novos e específicos diagnósticos sorológicos que irão contribuir para o controle da LVC assim como para o levantamento epidemiológico desta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- O agente etiológico e morfologia:

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 dos flebotomíneos.

2.2- Ciclo Biológico e transmissão:

A Leishmaniose visceral é transmitida pela fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Ao picar um animal infectado pra exercer o repasto sanguíneo, o insetoingere, juntamente com o sangue, células do SMF, leucócitos e macrófagos parasitados com as formas amastigotas. No tubo digestivo dos insetos, estas se multiplicam e transformam-se em promastigotas, adaptando-se às novas condições fisiológicas existentes. No esôfago e faringe, estas sofrem uma nova transformação para a forma paramastigota. Posteriormente, 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. Para adaptação às novas condições fisiológicas intracelulares existentes, as promastigotas transformam-se rapidamente em formas amastigotas. Quando os macrófagos estão densamente parasitados, rompem-se colocando em liberdade as amastigotas que serão fagocitadas novamente por outros macrófagos.

2.3- 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). Pode apresentar-se como uma zoonose ou antroponose.

No Brasil, a LV 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 (89%), seguido da região Sudeste (6%), região Norte (4%) e finalmente região Centro-Oeste (1%) (Monteiro *et al.*, 1994).

Belo Horizonte é considerada, atualmente, zona endêmica de LV (Alves & Bevilacqua, 2004). O município convive, desde 1993, com uma epidemia de calazar humano e canino. Nos últimos anos, o número de casos humanos e caninos de LV tem crescido, indicando um aumento na transmissão da doença (Silva, *et al.*, 2001).

Embora fosse considerada doença de áreas predominantemente rurais, recentemente a LV têm-se estabelecido em áreas urbanas ou peri-urbanas, onde o vetor encontra condições ideais para a manutenção do seu ciclo de vida (Caldas *et al.*, 2001). Com a emergência da doença nas áreas urbanas, a LV assumiu importante papel na saúde pública (Marzochi *et al.*, 1994).

Do ponto de vista epidemiológico, a leishmaniose canina tem sido considerada mais importante do que a doença humana, visto que tem maior prevalência e muitos animais assintomáticos de áreas endêmicas apresentam parasitos na pele (Marzochi *et al.*, 1985). A constante presença de cães infectados também contribui para o alastramento da doença durante as migrações de pessoas para áreas não endêmicas (Arias *et al.*, 1996).

Um outro fator que contribui para a alta prevalência da leishmaniose nas populações é que as medidas de controle eliminam apenas cães soropositivos, e não todos os cães infectados, pois a maioria dos cães doentes não apresenta sintomas clínicos (Moreno & Alvar, 2002).

O controle da LVC ainda é feito através da eliminação dos cães infectados (Alencar, 1961), devido à ineficácia na terapêutica desta enfermidade. No Brasil, o controle consiste, juntamente com o sacrifício de animais, na adoção de medidas de

proteção individual em cães (uso de coleiras impregnadas com Deltametrina a 4%), no tratamento dos casos humanos e combate ao vetor, utilizando-se inseticidas residuais nos domicílios.

2.4- Patogenia da LVC

Na LV canina, 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.

Diante da grande variação de sintomas clínicos, Marcianti *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. (Deane & Deane, 1955^b; Cunha, 1938; 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 LV canina 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- γ (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 (Cardoso & Cabral, 1998; Genaro, 1993).

Em um estudo realizado na cidade de Montes Claros, MG, verificou-se que todas as raças de cães, incluindo os sem raça definida, se infectam. Dentre as raças, oito se mostraram mais susceptíveis à infecção: Dálmata, Weimaraner, Boxer, Husky Siberiano, Pastor Belga, Fox Terrier, Dogue Alemão e Cocker. (França-Silva, 1997).

2.5- Imunodiagnóstico canino:

O diagnóstico presuntivo da LVC pode ser realizado com base nos resultados dos testes laboratoriais juntamente com dados clínicos e epidemiológicos. Porém, um diagnóstico definitivo da doença requer a demonstração do parasita em tecidos suspeitos (Sachs, 1993). A maior dificuldade no diagnóstico deve-se ao fato dos sinais clínicos da doença serem muito semelhantes aos de outras enfermidades infecciosas, além de reações cruzada nos testes sorológicos (Grimaldi & Tesh, 1993).

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).

A cultura do material aspirado aumenta a probabilidade do encontro de amastigotas (Genaro, 1993 e Ozbel *et al.*, 2000), porém, o método é demorado e tem baixa sensibilidade, não sendo adequado para diagnóstico rotineiro (Ferrer, 1997).

O exame histopatológico dos fragmentos da pele e linfonodos podem ser usados como método diagnóstico, mas deve-se ter conhecimento de que o infiltrado inflamatório não é exclusivo de LV e que apenas o encontro de formas amastigotas determina a positividade do teste (Gross, Ihrke & Walder, 1992).

Com o intuito de se evitar problemas relacionados à demonstração do parasita, foram desenvolvidos métodos diagnósticos não invasivos que detectam anticorpos no soro de pacientes, já que os portadores de LV apresentam hipergamaglobulinemia (Tavares, Fernandes & Melo, 2003).

A Reação de Fixação do Complemento é uma técnica que detecta a presença de grandes quantidades de anticorpos séricos no soro de cães infectados (Alencar, 1959). Até recentemente, essa técnica era muito utilizada, tendo sido posteriormente substituída pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Ferrer, 1997).

A RIFI é um método amplamente usado no diagnóstico da LVC (Ferrer *et al.*, 1995; Mancianti, Pedonese e Poli, 1996), pois tem como grande vantagem a fácil preparação do antígeno, o que faz com que esse método seja, atualmente, o utilizado para diagnósticos soropidemiológicos em programas de controle no Brasil (Evans *et al.*, 1990).

Quando comparada com o diagnóstico parasitológico pela citologia de material obtido de aspirado de linfonodos, a RIFI mostrou-se mais sensível, sendo as taxas encontradas de 84.9% e 96.9%, respectivamente (Koutinas *et al.*, 1999).

A principal desvantagem da técnica, além de ser um método demorado e caro, é o grande número de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, principalmente o *Trypanosoma cruzi* (Bray, 1976). Em países europeus, a RIFI é amplamente utilizada, pois a especificidade da técnica não é ameaçada, já que os cães não são acometidos pelas doenças parasitárias caninas da América Latina (Gradoni, 2002).

O Ensaio imunoenzimático Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), é também amplamente utilizado no diagnóstico da LVC (Gradoni, 2002). É atualmente indicado como triagem para posterior confirmação pela RIFI nos inquéritos epidemiológicos no Brasil (WHO, 2003). Por esta razão, é a técnica utilizada para o diagnóstico de LV humana (Tavares, Fernandes & Melo, 2003).

No ELISA, os antígenos são derivados de promastigotas cultivadas *in vitro*, rompidas por ultra-som, expondo cerca de 30 antígenos somáticos e componentes de superfície. Este método também tem sua especificidade comprometida por reações

cruzadas com outras espécies de tripanossomatídeos e até mesmo por espécies filogeneticamente distantes (Tavares, Fernandes & Melo, 2003).

As técnicas sorológicas necessitam de níveis elevados de anticorpos e não fazem distinção entre as fases da doença quando os níveis de anticorpos estão próximos ou no ponto de corte (Aisa *et al.*, 1998). Neste sentido, as técnicas de identificação do antígeno através de Biologia Molecular assumem grande importância (Tavares, Fernandes & Melo, 2003).

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.

Apesar da alta sensibilidade e especificidade, o PCR ainda possui um alto custo e por isso não é utilizado em larga escala. A técnica é considerada sofisticada, pois requer vários passos após a amplificação do DNA (eletroforese, blotting e hibridação com sonda marcada). Além disso, o método se mostra mais válido em casos de pacientes infectados pelo vírus HIV, que apresentam altos níveis de parasitemia (De Doncker *et al.*, 2005).

O Xenodiagnóstico é um método empregado para a detecção e isolamento do patógeno, usando seu vetor artrópode. Embora não possa ser utilizado como técnica diagnóstica de rotina, se mostra útil na resolução de questões epidemiológicas sobre o estado clínico do animal (Alvar *et al.*, 1994; Gradoni, 2002).

Atualmente, com o intuito de se aumentar a especificidade dos testes sorológicos, tem-se buscado a caracterização molecular dos componentes do antígeno de *Leishmania* (Gradoni, 2002). O antígeno recombinante tem demonstrado maior

sensibilidade e especificidade em ensaios sorológicos quando comparados ao antígeno tradicional (Scalone *et al.*, 2002).

Os epitopos expressos na superfície de fagos selecionados por Phage Display oferecem uma alternativa aos antígenos recombinantes. O uso de proteínas recombinantes obtidas por técnicas clássicas de engenharia genética para imunodiagnóstico exige maior infra-estrutura, é mais caro e mais trabalhoso quando comparada à produção de peptídeos em fagos. Os fagos, após a seleção, podem ser “produzidos” em larga escala, pois ao infectarem uma bactéria, se multiplicam com facilidade e assim poderão ser dosados e utilizados como antígenos, tanto como fagos inteiros ou como peptídeos sintetizados, no imunodiagnóstico da LVC.

2.6- 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, através da técnica de Phage Display, é uma estratégia atrativa que pode ser aplicada para várias doenças na tentativa de se identificar seqüências específicas que se liguem a anticorpos presentes em tais amostras. Isto leva a um possível desenvolvimento de novos reagentes para testes de imunodiagnóstico mais simples e sensíveis, além do entendimento da participação de antígenos conhecidos ou desconhecidos na resposta imune (Manoutcharian, et al., 1999).

Essa técnica mostra um grande potencial na seleção e identificação de antígenos reconhecidos pelo soro de cães infectados, sem o prévio conhecimento destes antígenos. Além disso, se mostra como interessante alternativa a ser verificada no desenvolvimento de um método eficaz no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

2.7- Síntese de peptídeos em membrana de celulose. Método se 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 (0,6uL) com auxílio de um micropipetador automático, permitindo obter aproximadamente 50nanomols 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 NH₂ 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 dúvidas 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.

A membrana com os diversos peptídeos pode ser analisada por imunoenaios de colorimetria indireta. A capacidade dos peptídeos sintéticos se ligarem com anticorpos é avaliada por ensaios imunológicos e estes podem ser reproduzidos em torno de 30-40 vezes utilizando-se a mesma membrana, para anticorpos policlonais e até 70 vezes para anticorpos monoclonais. Devido às suas qualidades, estas metodologias vêm sendo amplamente empregadas em diversos estudos de identificação de determinantes antigênicos nas estruturas protéicas e predições de estruturas funcionais destas moléculas e para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Desenvolvimento de um método de ELISA para o imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina, utilizando como antígenos, peptídeos sintéticos selecionados através da técnica de Phage Display.

3.2- Objetivos específicos

- Purificar imunoglobulinas do isotipo IgG do soro de cães com leishmaniose visceral
- Selecionar epitopos expressos na superfície de fagos utilizando a técnica de Phage Display
- Sequenciar o DNA dos bacteriófagos que expressem os peptídeos de interesse para o imunodiagnóstico da LVC
- Realizar a síntese química dos peptídeos selecionados em membranas (SPOT) ou na sua forma solúvel
- Purificar por HPLC e espectrometria de massa os peptídeos produzidos
- Avaliar a reatividade de soros de cães com LV e frente aos antígenos sintéticos e frente ao antígeno bruto.
- Padronizar (sensibilidade e especificidade) o ensaio de imunodiagnóstico da LVC por ELISA utilizando os peptídeos sintéticos.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Soros dos cães

Os soros de cães com leishmaniose visceral utilizados neste trabalho (38) foram obtidos de cães do Hospital Veterinário da Escola de Medicina Veterinária da UFMG e cedidos pelo Prof. Dr. Rubens Antônio Carneiro da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. A positividade dos soros foi confirmada através de testes de ELISA e RIFI e a presença de parasitas nestes animais foi confirmado por punção medular.

Os soros de cães negativos para leishmaniose visceral canina (16) foram obtidos do laboratório do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte e cedidos pela Dra. Eliane Lobato. O diagnóstico destes cães foi realizado através de testes de RIFI e ELISA.

Soros de cães chagásicos (10) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Yezo de Miranda Castro da Universidade Federal de Ouro Preto. Estes soros foram previamente testados em ensaios com microplacas de ELISA sensibilizadas com antígenos de *Tripanosoma cruzi*. Todos os soros acusaram reação positiva para o agente etiológico em questão.

4.2- Teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) do tipo Indireto para Leishmaniose Visceral Canina

4.2.1- Obtenção do antígeno solúvel de *Leishmania chagasi*

O antígeno utilizado para a realização de ensaios imunológicos neste trabalho foi preparado da seguinte forma:

Promastigotas de *L. chagasi* em fase estacionária de crescimento foram retiradas de meio LIT (Liver Infusion Tryptose), lavadas três vezes em PBS estéril por centrifugação a 1000g por 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram rompidas por três ciclos de sonicação de 1 min a 20 Hz (Processador Ultrasônico). A suspensão foi sedimentada através de centrifugação a 4000g por 10 min. O sobrenadante, denominado antígeno solúvel, foi coletado, dosado a concentração de proteínas (Bradford, 1972) e armazenado a -20°C até uso posterior.

4.2.2-Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford

A cada poço de uma placa de microtitulação foram adicionados 180µL de Reagente de Bradford (Bradford, 1972) - 0.1% (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução aquosa com 5% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido fosfórico - e 20µL da amostra de proteína a ser dosada. Foi feita uma curva padrão, utilizando-se um padrão de 1mg/mL de albumina de soro bovina, variando de 0.5 a 20µg de proteína por 20µL de água e adicionados aos 180µL do Reagente de Bradford. A preparação foi incubada por 10 minutos, a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Os valores das absorbâncias foram determinados a 600nm em um leitor de ELISA (Bio-Rad). A concentração protéica da amostra foi determinada fazendo-se a equação da curva padrão, utilizando-se o programa Microsoft Excel.

4.2.3- Produção do conjugado IgG de carneiro anti-IgG de cão ligado a Peroxidase

O conjugado anti-cão-peroxidase utilizado neste trabalho foi produzido de acordo com Maria, 1998.

4.2.4- 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 1h.
- 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 10mL 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)

4.3- Extração e purificação de imunoglobulinas anti-*L.chagasi* e normais para seleção de fagos específicos

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) com algumas modificações, como descrito sucintamente a seguir:

- Sulfato de amônio saturado (50% P/V) foi adicionado lentamente aos pools de soros (positivos ou normais) com auxílio de uma bureta. O volume adicionado de sulfato e soro são sempre os mesmos. A precipitação de imunoglobulinas foi feita a 4°C por 12 horas, sob leve agitação. A mistura foi transferida para tubos falcon (Corning) de 50 ml e centrifugados por 30 minutos a 5000rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as imunoglobulinas presentes no precipitado foram novamente dissolvidas em tampão fosfato salino (PBS) 0,15M, pH 7,4 e dialisadas contra este mesmo tampão por 48 horas, trocando-se duas vezes ao dia para completa retirada do sulfato de amônio.

Após precipitação de imunoglobulinas totais com sulfato de amônio, as imunoglobulinas do isotipo IgG foram purificadas por cromatografia de imunoafinidade numa coluna de proteína A- Sepharose, como descrito por Chavez-Olórtegui et al. (1994). A concentração protéica de imunoglobulinas foi dosada pelo Método de Bradford e estas foram submetidas a ensaio de ELISA para verificar a reatividade frente ao antígeno solúvel de *L.chagasi*.

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

4.4- Teste de ELISA para verificação da reatividade da 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).

4.5- Técnica de Phage Display

4.5.1-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 (NaHCO₃ 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, 5X10¹² 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 4C, 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 (Luria-Bertani), 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 por 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). Finalmente, 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.

4.5.2-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 (NaHCO₃100mM 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^{10} 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.

4.5.3- 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 (NaHCO₃100mM 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.

4.5.4- 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 4.5.3, utilizando-se anticorpos de cão anti- antígeno de *Trypanosoma cruzi*.

4.5.5- Subclonagem dos clones positivos

Após os clones positivos serem identificados como descrito na etapa anterior; as bactérias aderidas na placa de cultura foram ressuspensas 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 1 ml de glicerol e estes foram aliquotados e estocados a -80°C.

4.6- Seqüenciamento de DNA viral

4.6.1- 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.

4.6.2- 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.

4.6.3- 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.

4.7- 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>

4.8- Ensaio sorológicos com fagos

4.8.1- Preparação dos fagos

A fim de se verificar a ligação dos fagos na placa e a reatividade destes com soros de cães positivos para LV, foram realizados ensaios de ELISA, após prévia preparação, como demonstrado abaixo:

- Os clones positivos e conservados em glicerol foram plaqueados em meio LB agar com tetraciclina 20µg/ml overnight a 37°C.
- Foi realizado um pré inoculo de cada clone em 10 ml de LB com tetraciclina a 37°C, 225 rpm, overnight.
- O meio foi centrifugado a 4°C, 4000 rpm por 30 minutos.

- O *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi precipitado overnight a 4°C com PEG 8000/NaCl (20% 2,5M de NaCl).
- O precipitado foi coletado após duas centrifugações a 8000 rpm, a 4°C por 40 minutos.
- Finalmente, o *pellet* foi dissolvido em 100µl de Tris/NaCl, e dosado por Bradford, como descrito anteriormente.

4.8.2- Ensaio de ELISA usando fagos totais como antígenos

• Uma placa de ELISA (Falcon) foi sensibilizada com uma concentração de 10^{10} fagos positivos por well. Como controle positivo da reação, uma parte da placa foi sensibilizada com antígeno de *L.chagasi*.

• 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 três vezes com solução de lavagem e em seguida foi adicionado o pool de soros de cães positivos para LV diluídos 1:100 em tampão de incubação (caseína 0.25% em PBS 0.05M, pH 7.4 e 0.05% Tween 20), a 37°C durante 1h.

• A placa foi lavada novamente seis vezes com solução de lavagem. Foram adicionados 100µL de tampão de incubação com anticorpo anti-Ig total de cão conjugado a peroxidase (Sigma) diluído (1:1000), a 37°C durante 1h.

• 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 pH 5,0). A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A interrupção da reação foi feita com 10µL de solução de ácido sulfúrico (1:20) e a leitura espectrofotométrica feita a 492 nm.

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

Após a obtenção da seqüência peptídica, procedeu-se à síntese química para a produção do epitopo.

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 μ 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 μ 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 μ M de aminoácido foram colocados 21.6mg de HOBt (hidroxibenzotriazol) e 25 μ 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 3ml 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 β -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 3000rpm por 30 minutos, enquanto o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspendido em de água.

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

4.10- Purificação do peptídeo sintético

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). 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- microTM), e sua massa molecular foi confirmada.

4.11- Ligação do peptídeo ao BSA

Com o objetivo de melhorar a adesão do peptídeo à placa de Elisa, procedeu-se a ligação deste à molécula de BSA, como previamente descrito por Alvarenga et al., (2002).

4.12- Polimerização do peptídeo com glutaraldeído

A ligação do peptídeo ao glutaraldeído foi realizada como descrito por Machado de Ávila et al (2004).

4.13- ELISA utilizando peptídeos sintéticos

Para verificar a reatividade do peptídeo sintético frente ao pool soros dos cães com leishmaniose visceral, uma placa de Elisa da marca falcon foi sensibilizada com

0,5 ug/well de peptídeo purificado e a ela foi adicionado o pool de soros positivos partindo de uma diluição de 1:100. Como controle positivo, foi utilizado o antígeno bruto de *Leishmania*.

4.14- 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 leishamniose 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 7, 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 precipitados 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.

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, foi feito um ensaio de ELISA. O resultado do teste está representado na figura 1.

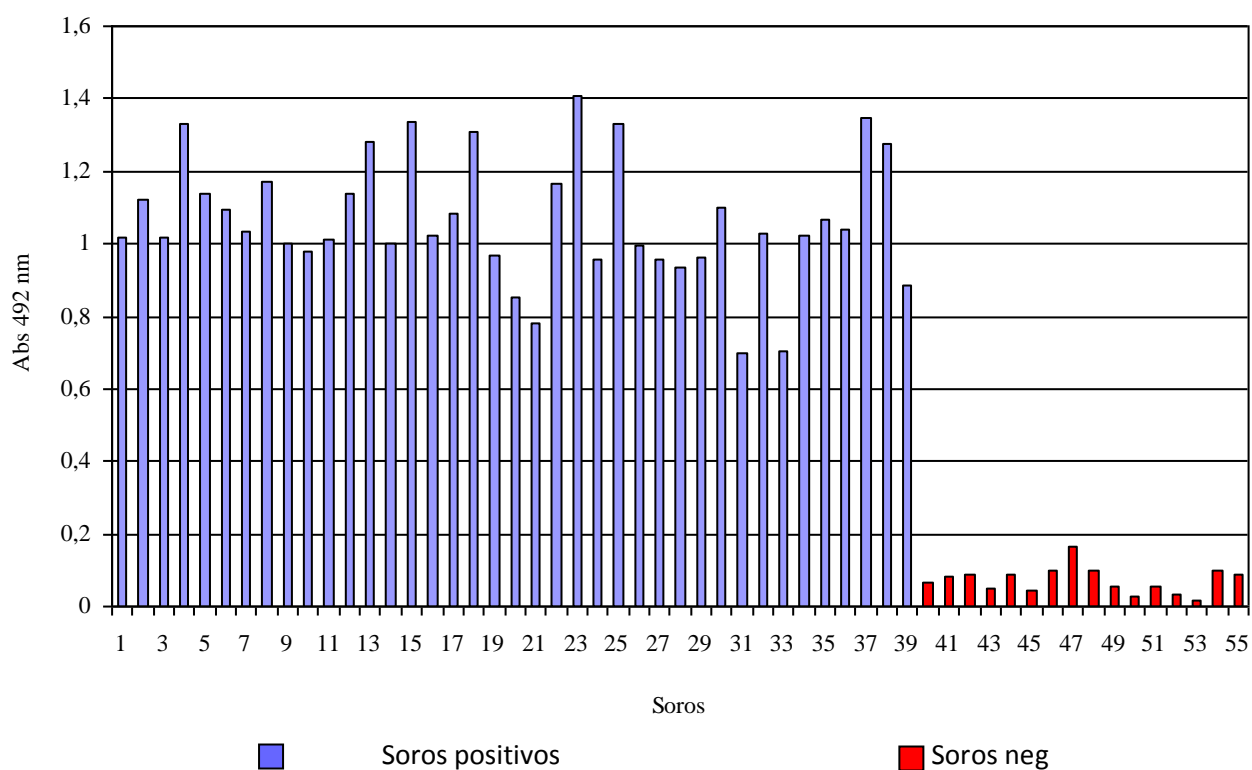


Fig. 1 - Reatividade dos soros de cães frente ao antígeno de *Leishmania chagasi*. A placa de ELISA foi sensibilizada com 0,5 µg/well de antígeno. Os soros foram usados na diluição inicial de 1:500. Foi utilizado anticorpo anti-cão conjugado à peroxidase diluído 1:1000.

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.

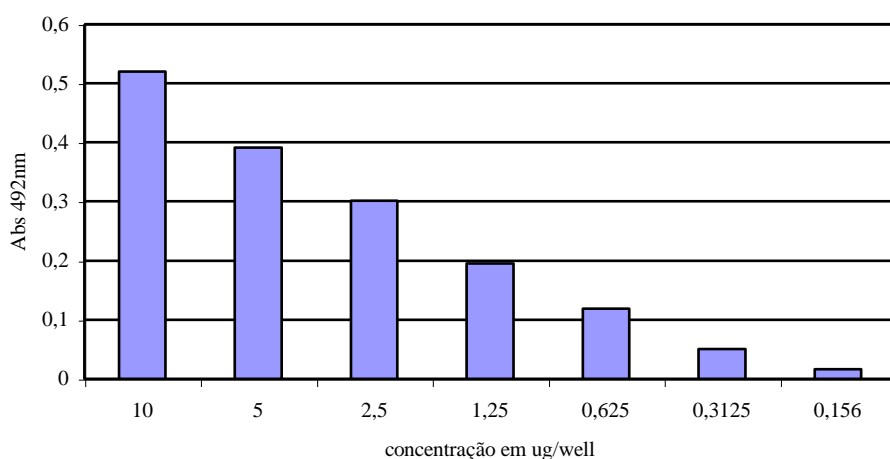
5.2- Reatividade das imunoglobulinas purificadas frente ao antígeno de *L.chagasi*

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 2. Verificamos em Fig. 2A que as IgGs anti- *L.chagasi* purificadas mantiveram sua a reatividade numa forma diretamente proporcional à concentração de imunoglobulina utilizada. Na Figura 2B 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)

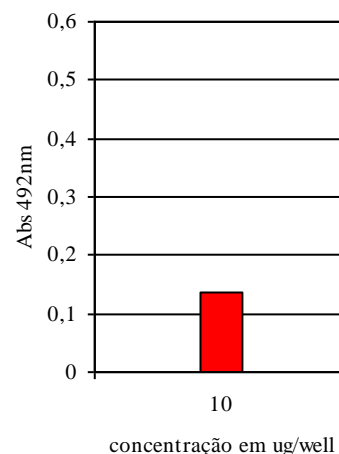


Fig. 2-A) Reatividade das imunoglobulinas purificadas. A placa de ELISA foi sensibilizada com 0,5µg/well de antígeno de *L.chagasi*. A concentração das imunoglobulinas variou de 10µg por well a 0,16µg por well. **B) Controle negativo.** Foi usada 10 µg de imunoglobulina do pool de soros negativos.

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 3). 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.

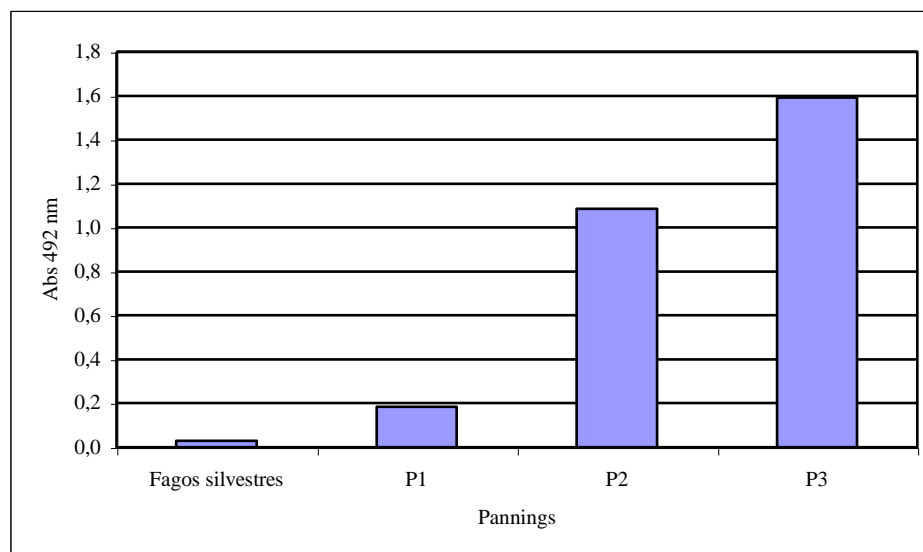


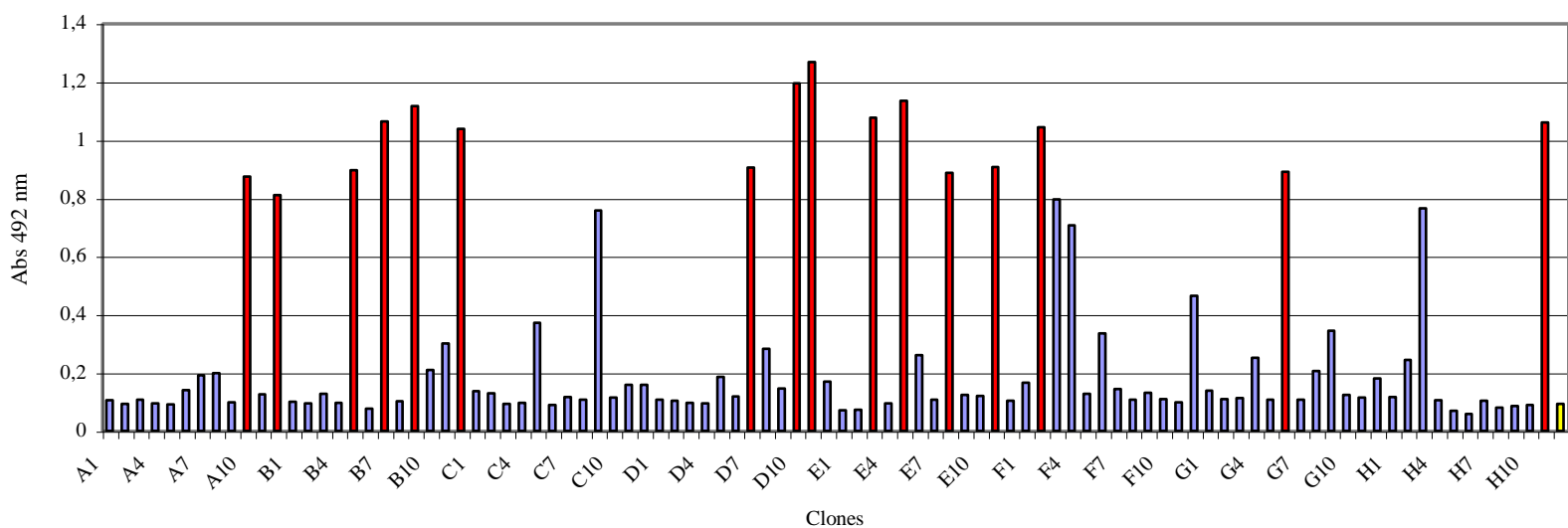
Fig. 3 - Reatividade dos fagos após Pannings 1, 2 e 3. A placa foi sensibilizada com 10µg/mL do pool de Ig purificada anti *L. chagasi* e incubada com 10^{10} dos fagos eluídos dos três ciclos de seleção (P1, P2 e P3) e fagos silvestres como controle negativo. Foi empregado anticorpo anti-M13 conjugado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

Podemos observar na figura 3 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 4.5.3. 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.



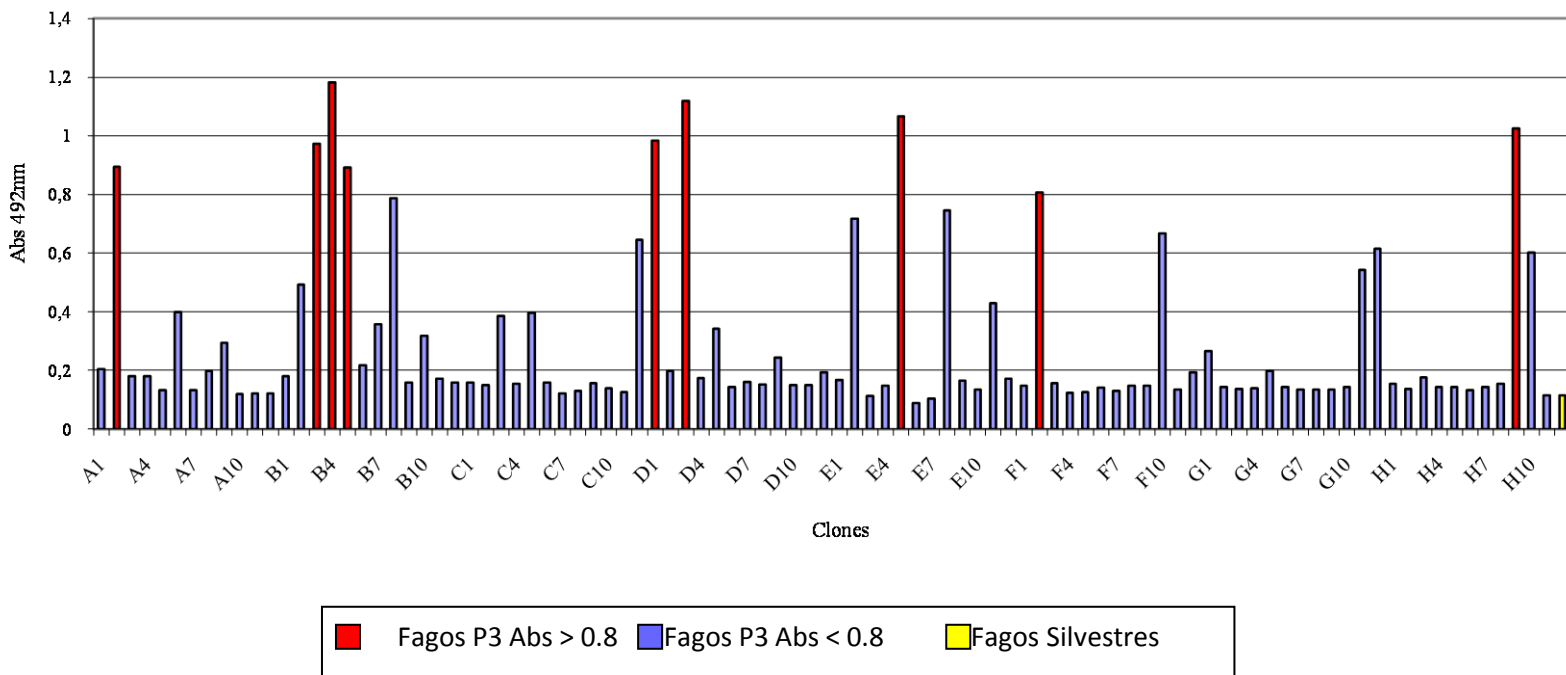


Fig. 4 – Reatividade dos fagos após o terceiro ciclo de seleção (P3) frente a Igs purificadas. A placa foi sensibilizada com 0,5µg/well de IgG de cão anti- *L.chagasi* e incubada com 50µL do sobrenadante de cultura de de K91 contendo os fagos de interesse. Como controle negativo foi utilizado 50µL do sobrenadante de cultura de K91 infectada por fagos silvestres. Foi empregado anticorpo anti-M13 conjugado à peroxidase (sigma)

A figura 4 mostra uma grande variabilidade dos clones frente às Igs 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 à Igs normais

Os 25 clones positivos tiveram sua reatividade analisada frente a imunoglobulinas de cães saudáveis. O resultado está representado na figura 5.

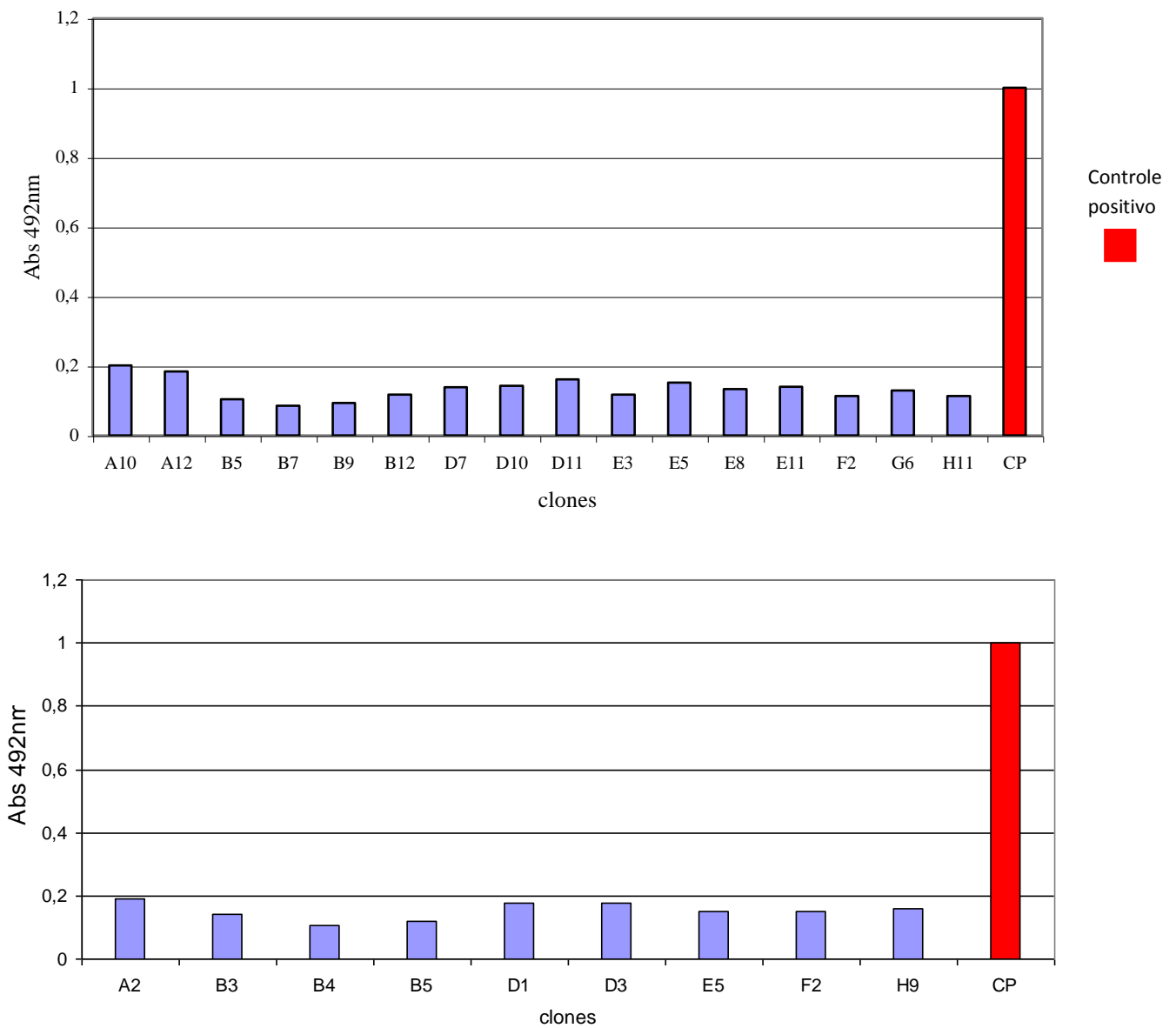


Fig. 5 – Reatividade dos clones positivos frente a IgG normal de cão. A placa foi sensibilizada com 10 ug/well do pool de imunoglobulinas de cães do grupo controle e incubada com 50µL do sobrenadante de bactérias K91 com os fagos de interesse. Como controle positivo, a placa foi sensibilizada com o pool de IgG anti-*Leishmania chagasi* e incubada com 50 uL do sobrenadante de um dos fagos selecionados.

A figura 5 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 foram sensibilizadas com anticorpos anti *T. cruzi*

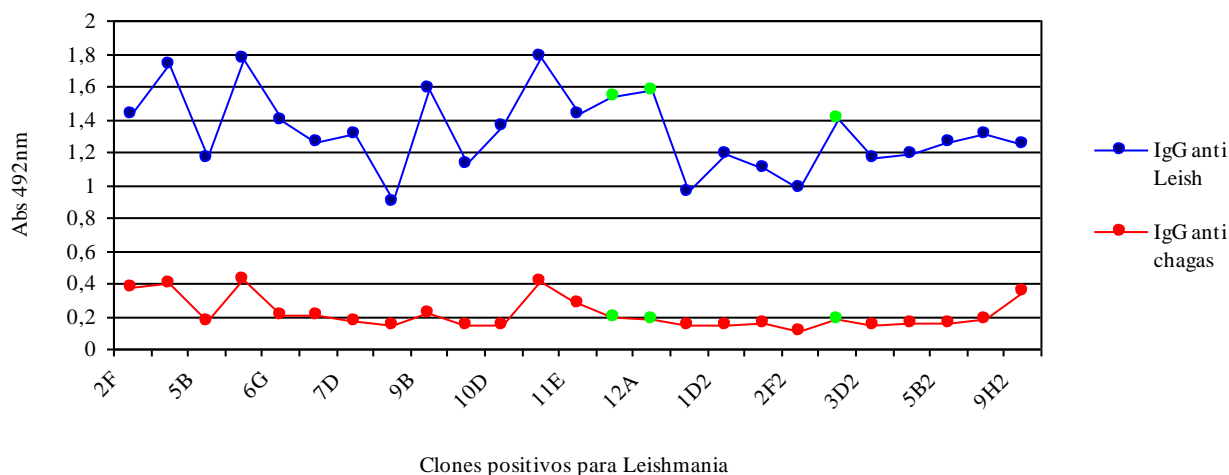


Fig. 6 – Reatividade dos clones selecionados frente a imunoglobulina de cão anti *T. cruzi*. A placa de ELISA foi sensibilizada com 10µg/mL de Ig de cão chagásico e incubada com 50 µL de sobrenadante de cultura de K91 contendo os fagos selecionados (Abs > 0.8). Foi empregado anticorpo anti- M13 conjugado à peroxidase diluído 1:3000.

A figura 6 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 absorvância 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 para seqüenciamento e para testes como antígenos totais na sensibilização

de placas no desenvolvimento de teste de ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

5.7- Seqüenciamento dos clones positivos

Os clones foram seqüenciados no NAGE, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG e apresentaram as seguintes seqüências de aminoácidos: 3B (TTDDDKLKKTLTYRS), 11H (XXXXXXXXXXXXXX), 12A (XXXXXXXXXXXXXX). A seqüência de aminoácidos dos clones 11H e 12A não estão descritas por que se iniciou o registro de patente.

5.8- Desenvolvimento do ELISA com fagos ligados na placa

A viabilidade dos fagos selecionados como antígenos ligados a microplacas de Elisa foi verificada. Pool de soros de cães com LV foram usados como primeiros anticorpos no ensaio de ELISA tipo indireto. A placas foram sensibilizadas com os fagos de interesse (10^{10} fagos/well). Como controle negativo, foi utilizado o pool de soros de cães normais. O resultados estão representados abaixo na figura 7.

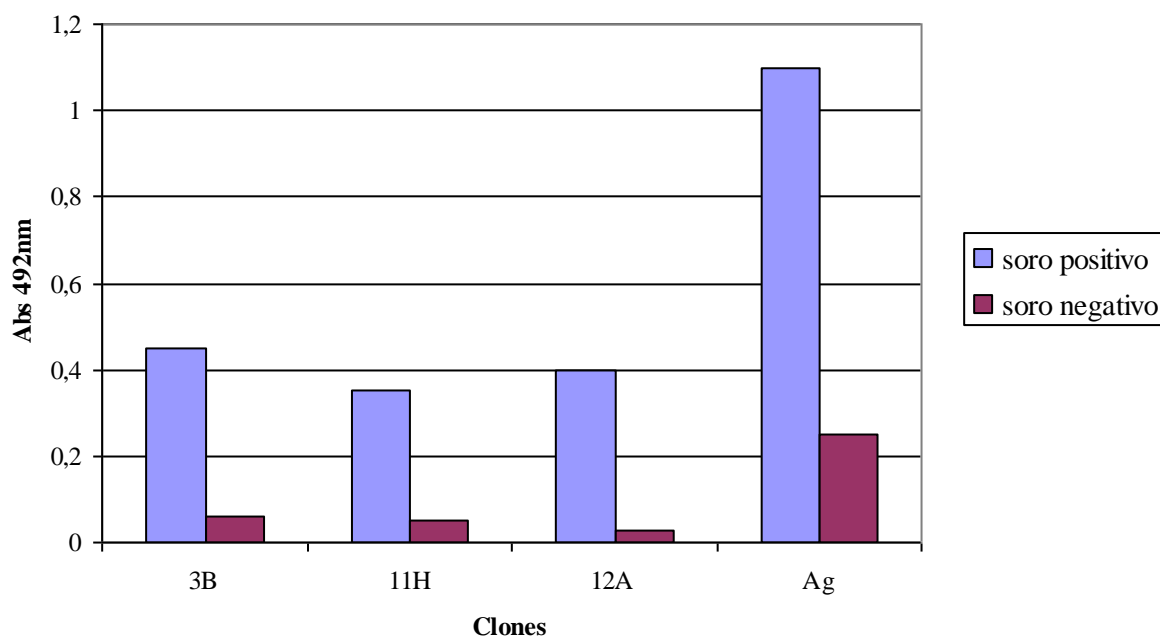


Fig. 7- Reatividade dos fagos com soros de cães positivos e normais. A placa foi sensibilizada com 10^{10} fagos/well. Os soros de cães foram utilizados em uma diluição de 1:100. Foi empregado anticorpo anti-IgG de cão conjugada à peroxidase diluído 1:1000.

De acordo com o gráfico representado na figura 7, todos os clones foram capazes de reconhecer os soros de cães com LV. Entretanto, o clone 3B apresentou maior reatividade dentre os três selecionados. Nesta mesma figura verificamos também que nenhum dos clones reagiu com anticorpos de soros de cães normais.

Uma vez verificado que o fago 3B expressando o peptídeo TTDDDKLKKTLTYRS apresentou maior reatividade, a próxima etapa do nosso trabalho foi realizar a síntese química deste na sua forma solúvel para sua posterior utilização como antígeno nos testes de ELISA. O peptídeo foi sintetizado pelo método F-moc síntese.

5.9- Purificação do peptídeo

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 8. O pico principal foi liofilizado e sua análise foi realizada por espectrometria de massa, que confirmou a massa molecular do peptídeo.

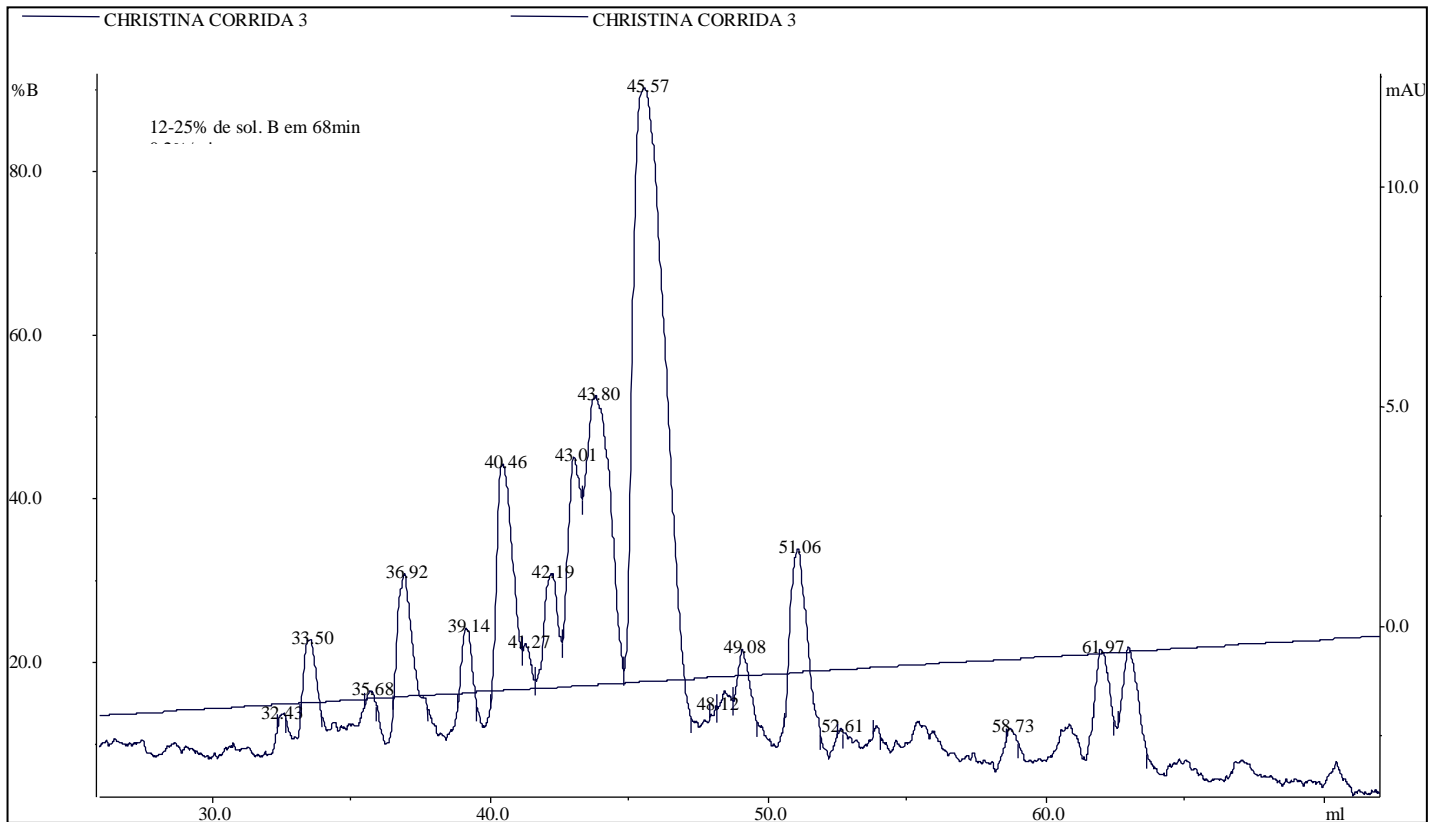


Fig. 8- Perfil de eluição do peptídeo sintético em coluna de fase reversa C18 em sistema de HPLC.

5.10- Espectrometria de massa

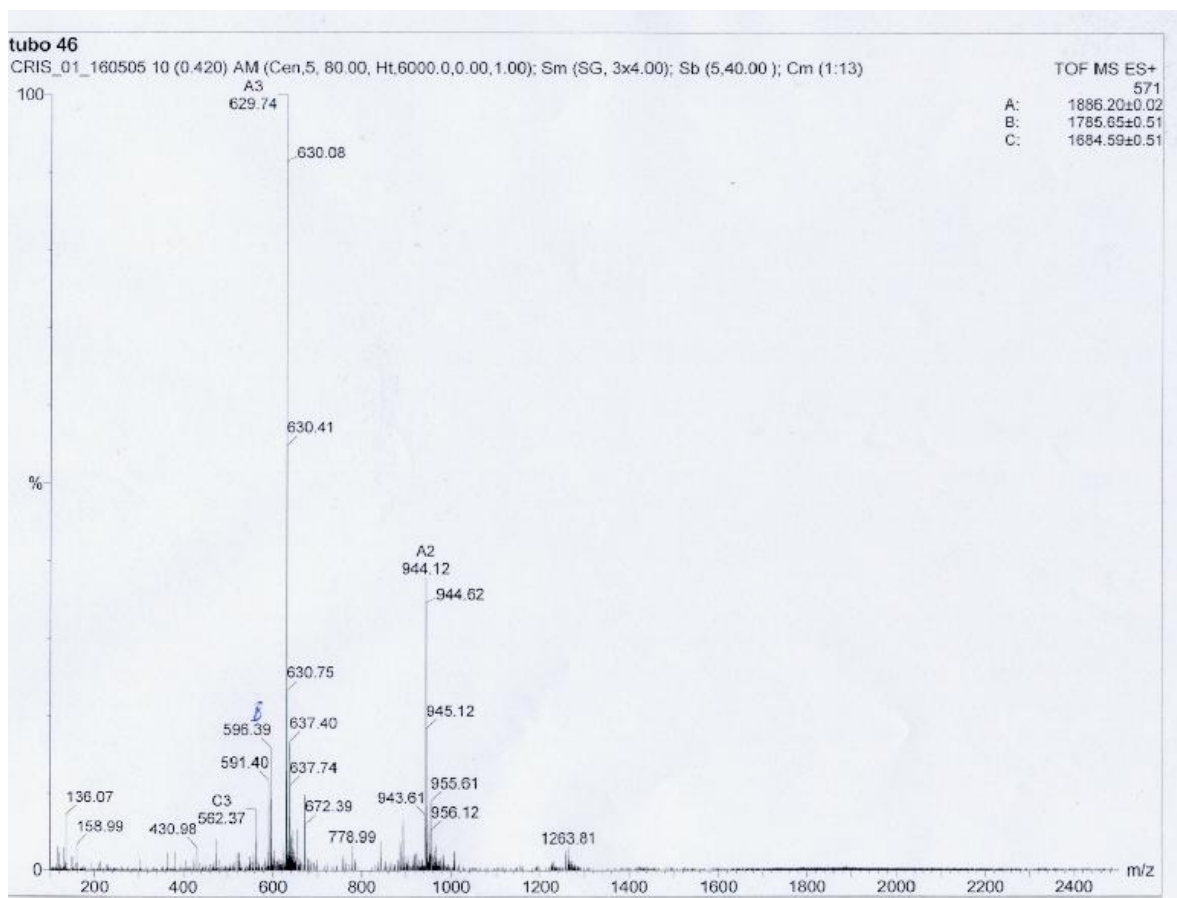


Fig. 9- Análise por espectrometria de massa do pico purificado com massa estimada de 1886 Daltons (Da).

5.11- Imunoensaios com o peptídeo sintético

Os ensaios de ELISA utilizando o peptídeo TTDDDKLKKTLTYRS, só, acoplado ao BSA e polimerizado com glutaraldeído como antígenos, ligados a microplacas, não apresentaram resultados capazes de serem quantificados com soros de cães previamente diagnosticados como positivos para leishmaniose.

Devido a estes resultados negativos e inesperados nós decidimos analisar a viabilidade do uso dos outros dois peptídeos. Para isto a estratégia utilizada foi a seguinte:

Previamente à síntese química solúvel destes peptídeos, nós os sintetizamos numa fase sólida, em membrana de celulose (spot synthesis). Os peptídeos permaneceram ligados às membranas para os respectivos imunoensaios.

5.12- 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 4.14. O resultado está representado na figura 10.

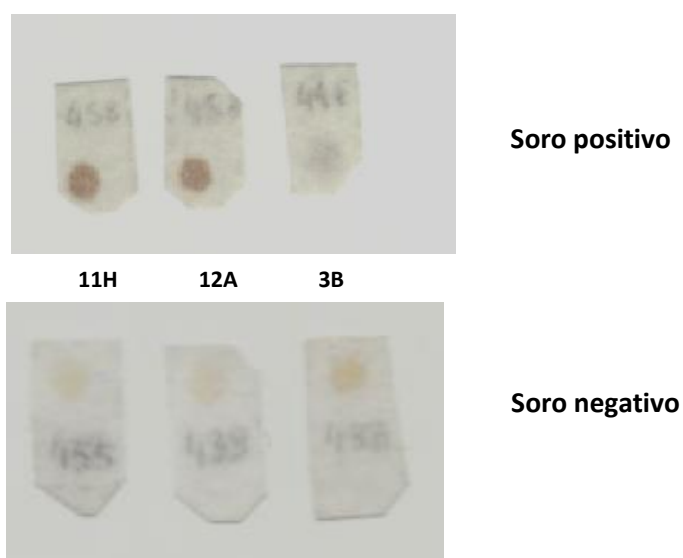


Fig.10- Análise da reatividade dos peptídeos sobre a membrana com pool de soros positivo e negativo. Os soros foram usados na diluição 1:250. Foi empregado anticorpo anti-IgG de cão conjugada à peroxidase diluído 1:500.

De acordo com a figura 10, podemos perceber que os clones 11H e 12 A mostraram reatividade apenas frente aos soros positivos.

O clone 3B, como já era esperado, não reagiu também com o soro positivo ou negativo nestas condições.

6- DISCUSSÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) apresenta amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em áreas tropicais e subtropicais, podendo ser causada por três espécies de *Leishmania*: *Leishmania donovani*; *L.(L). infantum* e *L.(L). chagasi*. Na América, a LV ou calazar tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Laison & Shaw, 1987).

A LV é uma doença crônica que apresenta crescente incidência no Brasil, podendo assumir formas graves e letais quando não tratada adequadamente, principalmente em crianças, idosos, e pacientes portadores de co-infecção com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Hoje em dia, a doença encontra-se em plena expansão e urbanização em cidades de grande e médio porte, tornando-se deste modo, preocupação para os órgãos de saúde Pública (Silva *et al.*, 2001).

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 *Lutzomyia Longipalpis*. Os cães domésticos constituem um importante reservatório e são responsáveis pela natureza endêmica/epidêmica da doença (Silva *et al.*, 2001).

A apresentação clínica da Leishmaniose Visceral canina (LVC) é consequência de interações complexas entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro (Santos-Gomes *et al.*, 2002). Assim sendo, a expressão imunológica e clínica da doença varia de um animal para outro e mais de 50% dos cães não apresenta nenhum sintoma. Por esse motivo, é necessário o emprego de duas ou mais técnicas para um diagnóstico seguro da doença (Fisa *et al.*, 2001)

Tal diversidade de sintomas dificulta o diagnóstico da LVC, que vai desde o emprego de técnicas convencionais de pesquisa do parasita até as modernas técnicas de Biologia Molecular e Imunologia (Tavares, Fernandes e Melo, 2003).

O aspirado de medula óssea e linfonodos é o método diagnóstico mais usado pelos clínicos veterinários, já que o encontro de uma só amastigota já é suficiente para determinar a positividade do exame. Porém, esse método possui sensibilidade de apenas 50% nos aspirados de medula óssea e menos de 30% naqueles de linfonodos (Ferrer, 1997). Além disso, quanto menos sintomas o animal apresentar, menor será a sensibilidade do exame parasitológico (Aisa *et al.*, 1998).

A cultura do material aspirado aumenta a probabilidades de encontro do parasita (Genaro, 1993 e Ozbel *et al.*, 2000), porém o método é demorado e não é muito sensível não sendo adequado para o diagnóstico clínico rotineiro (Ferrer, 1997).

Visando evitar os problemas relacionados à demonstração do parasita, foram desenvolvidos métodos diagnósticos não invasivos, sendo os que detectam anticorpos no soro do paciente os mais utilizados, uma vez que os cães portadores de LV apresentam hipergamaglobulinemia (Tavares, Fernandes e Melo, 2003). As técnicas sorológicas são efetivas quando o animal apresenta um alto nível de anticorpos. Entretanto, em áreas endêmicas, o uso destas técnicas se torna limitado devido aos baixos níveis de anticorpos específicos (Fisa *et al.*, 2001).

Inicialmente, a reação de fixação do complemento foi utilizada pra o diagnóstico sorológico da LVC (Alencar, 1959), tendo sido posteriormente substituída pela reação de imunofluorescência Indireta (RIFI) (Genaro, 1993).

A RIFI é amplamente utilizada no diagnóstico da LVC (Ferrer, *et al.*, 1995; Mancianti, Pedonese e Poli, 1996), apresentando altas taxas de sensibilidade e especificidade. Porém, na América Latina, a especificidade da técnica fica comprometida quando é utilizada em áreas onde o cão sofre também de Leishmaniose tegumentar ou doença de Chagas.

O ELISA é também é um método amplamente utilizado no diagnóstico da LVC, sendo atualmente indicada como triagem para posterior confirmação pela RIFI nos inquéritos epidemiológicos no Brasil (WHO, 2003). No ELISA, os antígenos utilizados são derivados de promastigotas cultivadas *in vitro* e rompidas por ultra-som, expondo cerca de 30 antígenos somáticos e inúmeros componentes de superfície. Este método tem seus níveis de especificidade comprometidos por reações cruzadas com outras espécies de tripanosomatídeos ou até mesmo por espécies filogeneticamente distantes (Tavares, Fernandes e Melo, 2003).

Com o objetivo de identificar novos antígenos, mais sensíveis e específicos, escolhemos uma nova estratégia de seleção, a técnica de *Phage Display*. Esta metodologia já foi utilizada na seleção de potenciais antígenos para o imunodiagnóstico de diversas doenças (Tafi *et al.*, 1997; Minenkova *et al.*, 2001; Kouzmitcheva *et al.* 2001; Santamaria, 2001; Marston *et al.*, 2002). A utilização de soros não purificados de pacientes portadores de diversas infecções como fonte de ligantes (anticorpos) para selecionar os fagos de interesse das bibliotecas foi feita por vários destes autores.

Em nosso trabalho, com o objetivo de aumentar a especificidade da seleção, os anticorpos 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. O método utilizado para a purificação dos anticorpos (IgG anti *L.chagasi*) visa diminuir a possibilidade de seleção de fagos reconhecidos por anticorpos naturais ou por anticorpos contra outras doenças presentes nos soros destes cães.

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 5 vezes menor de imunoglobulinas e conseqüentemente apenas os fagos que possuísem uma maior afinidade pelas moléculas alvo seriam selecionados e amplificados novamente.

Vinte e cinco clones considerados os mais reativos frente ao anticorpo específico foram testados frente a IgGs de soros de cães normais. Entretanto, nenhum deles apresentou reatividade. Então, os mesmos clones foram testados agora contra IgGs de cães portadores de doença de Chagas, experimentalmente infectados, para verificação da reatividades cruzada destes clones. Destes clones, apenas três apresentaram, simultaneamente, alta reatividade com anticorpo anti *L. chagasi* e baixa reatividade com anticorpo anti *Trypanosoma cruzi*. Estes resultados sugerem que os demais clones apresentaram reação cruzada por que provavelmente foram selecionados por moléculas de imunoglobulinas que reconheciam seqüências que mimetizavam antígenos comuns a ambos parasitas.

Manoutcharian *et al.* (1999), utilizaram a técnica de Phage Display para imunodiagnóstico da neurocisticercose humana e conseguiram selecionar dois clones que expressavam em sua superfície peptídeos selecionados por moléculas presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com neurocisticercose. Estes clones foram adicionados a microplacas para ELISA e testados frente ao líquido cefalorraquidiano de portadores da neurocisticercose. O resultado foi um índice de sensibilidade de 78 e 85% e especificidade de 100% para ambos os clones. Com isso, podemos perceber que a técnica de Phage Display, através da seleção de peptídeos por afinidade, tem se

mostrado como uma ferramenta viável (simples e eficaz) para o diagnóstico imunológico de doenças parasitárias.

Os três clones positivos (3B, 11H e 12A) apenas com anticorpos anti-*Leishmania chagasi* foram inicialmente selecionados e o DNA deles foi seqüenciado. Os DNAs foram analisados e a seqüência de aminoácidos determinada. Para verificar a existência de homologia com proteínas de *L. chagasi* ou de outros organismos, foi realizada a análise em banco de dados (BLAST-ALTSCUL *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 expressos nos clones escolhidos, estes peptídeos foram então sintetizados sobre uma membrana de celulose, para posterior imun análise com soros individuais de animais controles e animais portadores de leishmaniose visceral canina. O peptídeo TTDDDKLKKTLTYRS do clone que apresentou a maior reatividade frente ao pool de soros de animais doentes (3B), foi também sintetizado em sua forma solúvel, com a finalidade de ser usado, como antígeno, diretamente nas placas de ELISA.

A cadeia peptídica obtida no seqüenciamento do clone 3B apresenta em sua extensão 15 aminoácidos que determinam em sua somatória um caráter hidrofílico predominantemente positivo. Destacam-se, na seqüência, por essas propriedades três lisinas (K), uma Arginina (R) que possuem cargas positivas em pH neutro, somando-se ainda, aminoácidos como quatro Treoninas (T) e uma Serina (S) que apresentam hidroxilas livres em suas cadeias laterais alifáticas acentuando ainda mais o caráter polar desse peptídeo. Fazem parte, também, dessa seqüência o aminoácido Tirosina (Y) que apresenta cadeia lateral volumosa com anel aromático sendo este considerado hidrofóbico podendo-se estender o caráter apolar para as três Asparaginas (N) presentes consecutivamente nesse peptídeo determinando uma região hidrófoba na seqüência quando essa se encontra em pH neutro

O método da síntese química manual de peptídeos em fase sólida (método F-moc) tem nos permitido produzir um peptídeo com alto grau de pureza, fato que foi confirmado por espectrometria de massa, mostrando que o método utilizado para síntese peptídica foi eficiente. foi capaz de produzir um peptídeo relativamente puro, fato que

foi confirmado por espectrometria de massa, mostrando que o método utilizado para síntese peptídica foi eficiente. Seguindo esta mesma metodologia, outros peptídeos foram anteriormente sintetizados e utilizados para testes de imunodiagnóstico (Tsang *et al.* 1989; Greene *et al.*, 2000).

O peptídeo sintético TTDDDKLKKTLTYRS ao ser testado com o pool de soros de cães com *L. chagasi*, não mostrou reatividade. Este resultado foi pela primeira vez observado e nos chamou muito a atenção. Buscando explicação para este resultado inusitado, verificamos que, Chirinos-Rojas *et al.* (1999), conseguiram selecionar, por Phage Display, um mimotopo que foi capaz de inibir fortemente a citotoxicidade mediada por TNF- α em camundongos e humanos em células L929. O mimotopo identificado não mostrou homologia com a estrutura primária de nenhum dos domínios extracelulares dos receptores de TNF- α , sugerindo que este mimotopo representa ou mimetiza um epitopo conformacional envolvido com a ligação ao TNF- α .

Após ser sintetizado pela técnica de F-moc síntese, o peptídeo mostrou uma baixa capacidade de inibição da citotoxicidade quando comparado ao mimotopo exposto pelo fago. Esses dados mostram a importância da apresentação do mimotopo para suas atividades biológicas. Além disso, uma seqüência peptídica exposta na superfície de um fago pode adotar uma conformação diferente quando comparada ao peptídeo livre. Rudolf *et al.*(1998) também afirmam que o peptídeo selecionado, quando sintetizado, sofre uma mudança conformacional, o que muitas vezes, pode acarretar a inativação deste. Os resultados demonstrados por estes autores podem explicar a perda da atividade antigênica de nosso peptídeo após sua síntese química.

Para tentar verificar a antigenicidade dos outros dois peptídeos selecionados (11H e 12A) após síntese química, utilizou-se, previamente à sua síntese solúvel, uma das metodologias mais amplamente utilizadas para a identificação de epitopos, a técnica de *Spot-Synthesis* (Choulier *et al.*, 2001; Alvarenga *et al* 2002, Machado de Ávila *et al*, 2004).

Esta etapa iniciou-se com a síntese paralela, sobre uma membrana de nitrocelulose, dos três peptídeos, inclusive do peptídeo não reativo (3B).

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.

Estes resultados permitem agora supor que os peptídeos reconhecidos nas membranas podem ser sintetizados na sua forma solúvel sem perder sua atividade antigênica e poderão, posteriormente, serem usados como antígenos na sensibilização de microplacas de ELISA.

7- CONCLUSÕES

- A técnica de *Phage Display* obteve êxito em selecionar fagos que possuem alta afinidade com o ligante
- O uso da técnica de ELISA é eficiente para selecionar clones positivos
- O uso da técnica de Phage Display possibilitou a seleção de três epitopos (lineares ou conformacionais) ainda não descritos, para o imunodiagnóstico da LV
- O peptídeo 3B selecionado por Phage Display e sintetizado manualmente pelo método F-moc não possui atividade antigênica por se tratar de um falso-peptídeo
- Os peptídeos 11H e 12A selecionados por Phage Display possuem atividade antigênica

8- PERSPECTIVAS

- Sintetizar os peptídeos 11H e 12A na sua forma solúvel
- Realizar os imunoenaios com os peptídeos sintéticos utilizando os soros individuais de cães positivos para leishmaniose, negativos e portadores de outras doenças.
- Desenvolvimento e padronização de um teste de ELISA para leishmaniose canina usando como antígenos os dois peptídeos sintéticos.
- Imunolocalização no parasita de antígenos mimetizados pelo peptídeo sintético.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AISA, M.J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGO, M.; FISA, R.; RIERA, M.C.; DE COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of Western Blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of pattern. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.58, n.2, p.154-159, 1998.

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

ALENCAR, J.E. Profilaxia do Calazar no Ceará, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.3, n.4, p.175-180, 1961.

ALENCAR, J.E. & NEVES, J. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: *Veronesi, R.ed. Doenças infecciosas e parasitárias*. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.724-738, 1982.

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.

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.

ARIAS, J.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *European Infectious Diseases*, v.2, n.2, p.145- 146, 1996

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>

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.

BRAY, R. S. Leishmaniasis. *Immunological Investigations of Tropical Parasitic Diseases*, (Houba., ed) Churchill Livingstone, Edinburgh, p.65-83, 1976..

CABRERA, M.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.; MARZOCHI, M.C.; XAVIER, S.C.; DA SILVA, A.V.; JANSEN, A.M. Canine Visceral Leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v.45, n.2, p.79-83, 2003.

CALDAS, A.J.; Silva, D.R.; Pereira, C.C.; Nunes, P.M.; Silva, B.P.; Silva, A.A.; Barral, A.; Costa, J.M. **Leishmania (Leishmania) chagasi** infection in children from

an endemic area of visceral leishmaniasis in the São Luis Island-MA, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, n.5, p.445-451, 2001.

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

CHIRINOS-ROJAS, C.L.; STEWARD, M.W.; PARTIDOS, C.D. A phage displayed mimotope inhibits tumour necrosis factor- α -induced cytotoxicity more effectively than the free mimotope. *Immunology*, v.96, p.109-113, 1999.

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.

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^b.

DE DONCKER, S.; HUTSE, V.; ABDELLATI, S.; RIJAL, S.; SINGHKARKI, B.M.; DECUYPERE, S.; JACQUET, D.; LE RAY, D.; BOELAERT, M.; KOIRALA, S.; DUJARDIN, J.C. A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.99, p.25-31, 2005.

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.

EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA, J.M.; MCAULLIFE, I.T.; LOPES, U.G.; PEARSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. Canine Visceral Leishmaniasis in the Northeast Brazil: Assessment of Serodiagnostic Methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.42, p.118-123, 1990.

FERRIERES, G.; CALZOLARI, C.; MANI, J.C.; LAUNE, D.; TRINQUIER, S.; LAPRADE, M.; LARUE, C.; PAU, B.; GRANIER, C. Human cardiac troponin I: precise identification of antigenic epitopes and prediction of secondary structure. *Clinical Chemistry*, v.44, p.487-493, 1998.

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

FERRER, L.; AISA, M.J.; ROURA, X.; PORTUS, M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Records*, v.136, [s.n.], p.514-516, 1995.

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.

FRANÇA-SILVA, J.C. Leishmaniose Visceral Canina no Município de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. 1997. 133p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.

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.

GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. **Leishmania infantum** infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medicine Veterinary Entomology*,v.1, n.4, p.339-342, 1987.

GRADONI, L. The diagnosis 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.

GREENE, R. M.; HANCOCK. K.; WILKINS, P. P.; TSANG, V. C. W. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14 and 18 KDa related, diagnostic antigens. *Journal of Parasitology*, v.86, n.5, p.1001-1007, 2000.

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.

GROSS, T.L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. Infectious nodular and diffuse granulomatous and pyogranulomatous diseases of the dermis: a macroscopic and microscope evaluation of canine and feline skin diseases. *Veterinary Dermopathology*, p.163-189, 1992.

GUARGA, J.L.; LUCIENTES, J.; PERIBANEZ, M.A.; MOLINA, R.; GRACIA, M.J.; CASTILLO, J.A. Experimental infection of **Phlebotomus perniciosus** and determination of the natural infection rates of **Leishmania infantum** in dogs. *Acta Tropica*, v.77, [s.n.], p.203-207, 2000.

HOHNE, W.E.; KUTTNER, G.; KIEBIG, S.; HAUSDORF, G.; GRUNOW, R.; WINKLER, K.; WESSNER, H.; GIEBMANN, E.; STIGLER, R.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BAEHR, R.V.; SCHOMBURG, D. Structural base of the interaction of a monoclonal antibody against p24 of HIV-1 with its peptide epitope. *Molecular Immunology*, v.30 p.1213-1221, 1993.

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.

KOUZMITCHEVA G.A., PETRENKO V. A., SMITH G. P. Identifying diagnostic peptides for Lyme disease through epitope discovery. *Clinical Diagnosti. Laboratorial Immunology.*, v.8, p.150-160, 2001.

LAISON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution : In : PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, v.1, [s.n.], p.1-120, Londres. Academic Press. 1987.

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).

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.

LIU, Z., SONG, D.; KRAMER, A.; MARTIN, A.C.; DANDEKAR, T.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BAUTZ, E.K.; DUBEL, S. Fine mapping of the antigen-antibody interaction of scFv215, a recombinant antibody inhibiting RNA polymerase II from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Recognition*. v.12, p.103-111, 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.

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, 1996.

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.

MARIA, W.S. Avaliação e correlação de ensaios in vitro e in vivo de antivenenos botrópicos. 1998. 100p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

MARSTON, E. L.; JAMES, A. V.; PARKER, J. T.; HART, J. C.; BROWN, T. M.; MESSMER, T. O.; JUE, D. L.; BLACK, C. M.; CARLONE, G. M.; ADES, E. W.;

SAMPSON, J. Newly characterized species specific immunogenic **Chlamydomphila pneumoniae** peptide reactive with murine monoclonal and human serum antibodies. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology.*, v.9, n.2, p.446-452, 2002.

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.

MICHALICK, M.S. Expansão da Leishmaniose Visceral na área urbana da grande Belo Horizonte. In: *Congresso Brasileiro de Medicina Tropical*, v.25, p.89, 1992, Belém do Pará.

MINENKOVA O., GARGANO N., DE TOMASSE A. ADAM-HCV, a new cocept diagnostic assay for antibodies to hepatitis C virus in serum. *European Journal of Biochemistry*, v.268, 4758-4768, 2001.

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.

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.

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.

OZBEL, Y.; OSKAM, L.; OZENSOY, S.; TURGAY, N.; ALKAN, M.Z.; JAFFE, C.L.; OZCEL, M.A. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Tropica*, v.74, [s.n], p.1-66, 2000.

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.

POSNER, R.G.; FAY, S.P.; DOMALEWSKI, M.D.; SKLAR, L.A.; Continuous spectrofluorometric analysis of formyl peptide receptor ternary complex interactions. *Molecular 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.

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.

RUDOLF, M.P.; VOGEL, M.; KRICEK, F.; RUF, C.; ZURCHER, A.W.; REUSCHEL, R.; AUER, M.; MIESCHER, S.; STADLER, B.M. Epitope specific antibody response to IgE by mimotope immunization. *The Journal of Immunology*, v.160, p.3315-3321, 1998.

SACHS, D.L. Leishmaniasis. In Warren, K. S. (ed.). *Immunology and Molecular Biology of Parasite Infection*. 3rd edition. Blackwell Scientific Publications, Boston, p.237-268, 1993.

SANTAMARIA, H. Phage Display application in clinical diagnosis. *La Revista de Investigacion Clinica*, v.55, p.711-718, 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.

SAVANI, E.S.; DE OLIVEIRA-CAMARGO, MC.; DE CARVALHO, M.R.; ZAMPIERI, R.A.; DOS SANTOS, M.G.; D'AURIA, S.R.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. The first record in the Americas of an autochthonous of **Leishmania (Leishmania) infantum chagasi** in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.120, n.3, p.229-233, 2004.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R.R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A.R.; FRANK, G.R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme- linked assay. *Veterinary Parasitology*, v.104, [s.n.], p.275-285, 2002.

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

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.

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.

TAFI, R.; BANDI, R.; PREZZI, C.; MONDELLI, M. U.; CORTESE, R.; MONACI, P.; NICOSIA, A. Identification of HCV core mimotopes: improved methods for the selection and use of disease related phage displayed peptides. *Biological Chemistry* , v.378, p.495-502, 1997.

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.

TESH, R.B. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.52, n.3, p.287-292, 1995.

TSANG, V. C.; BRAND, J. A.; BOYER, A. E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infective Diseases* , v.59, p.50-59, 1989

World Health Organization (WHO). Control of canine leishmaniasis. Technical Reports Series. World Health Organization, Geneva, n.793, p.106, 1990.

World Health Organization (WHO). TDR diseases/Diseases current portfolio < <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm> > 2003.

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