

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Farmacologia

Proteção contra a infecção por *Leishmania*  
(*Leishmania*) *amazonensis* pela imunização de  
camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos  
selecionados por *phage display* e *spot synthesis*

Miguel Angel Chávez Fumagalli

Orientador: Prof. Carlos Delfin Chávez Olortegui

Belo Horizonte  
Agosto de 2008

Miguel Angel Chávez Fumagalli

Proteção contra a infecção por *Leishmania*  
(*Leishmania*) *amazonensis* pela imunização de  
camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos  
selecionados por *phage display* e *spot synthesis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia  
do Instituto de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Mestre em Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2008

## **Dedicatória**

Para meus pais, Miguel e Susana pelo apoio, carinho e paciência. Obrigado por tudo, pois tudo o que tenho e sou devo a vocês.

Para meus irmãos, Arturo, Claudia e Yolanda, pela amizade e carinho.

Para Catarina, pelo carinho e força nos momentos difíceis.

Eu lhes dedico este trabalho.

## **Agradecimentos**

Quero agradecer:

Ao Professor Carlos Delfin Chávez Olortegui, por ter aberto as portas do laboratório para mim. Muito obrigado!

Ao Professor Eduardo A. Ferraz Coelho pela colaboração nos experimentos e pela prontidão em me ajudar. Muito Obrigado!

Ao Professor Tomaz Aroldo da Mota Santos, pelos ensinamentos que me ajudaram a ver de uma maneira diferente a Imunologia. Muito Obrigado!

Aos amigos do laboratório Ricardo, Liza, Cristina, Eric, Fernanda Marcela, Paulex, Diogo, Camila, Clara, Mariana, Vinício, Dulcilene, Clóvis, Alessandra, Danielle, Vanessa, Lourena, Gisele, Gabriela, Luciana, Gabriela, Thiago e Mariana. Muito Obrigado!

Ao curso de pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular pela possibilidade do aperfeiçoamento profissional. Muito Obrigado!

## Índice

Índice .....	7
Lista de Figuras.....	10
Lista de Abreviaturas .....	13
Abstract.....	15
Resumo.....	16
1. Introdução .....	2
2. Revisão da Literatura.....	5
2.1. Agente etiológico .....	5
2.2. Vetor .....	5
2.3. Hospedeiros.....	5
2.4. Ciclo Biológico.....	6
2.5. Epidemiologia.....	6
2.6. Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento. ....	8
2.7. Resposta Imune.....	10
2.8. A Técnica de “Phage Display”: Expressão de peptídeos na superfície de fagos.....	12
3. Objetivos .....	17
3.1. Objetivo Geral .....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. Material e Métodos.....	20
4.1. Parasitas.....	20
4.2. Preparação de extratos protéicos solúveis de <i>Leishmania</i> .....	20
4.3. Amostras de soros de cães.....	21
4.4. Teste ELISA para verificação da reatividade das IgGs purificadas .....	22
4.5. Técnica de phage display.....	23
4.5.1. Seleção dos peptídeos expressos na superfície dos fagos (bio-pannings).....	23
4.5.2. ELISA para testar a reatividade dos fagos nos três ciclos de bio-seleção .....	25
4.5.3. Screening dos clones de fagos selecionados.....	26
4.5.4. Especificidade dos clones positivos frente às IgGs de cães saudáveis.....	27
4.5.5. Teste de reação cruzada dos clones positivos frente às IgGs de cães com doença de Chagas	27

4.5.6.	Subclonagem dos clones positivos.....	27
4.6.	Seqüenciamento do DNA viral .....	28
4.6.1.	Extração do DNA .....	28
4.6.2.	Dosagem do DNA .....	28
4.6.3.	Seqüenciamento automático capilar .....	28
4.6.4.	Identificação dos peptídeos selecionados .....	28
4.6.5.	Análise de homologia .....	29
4.7.	Síntese e imunoenaios dos peptídeos em membranas de celulose .....	29
4.8.	Síntese química dos peptídeos em fase sólida – Método F-moc .....	30
4.9.	Purificação dos peptídeos sintéticos .....	31
4.10.	Polimerização dos peptídeos sintetizados com glutaraldeído .....	32
4.11.	Análise por eletroforese em gel de policrilamida dos peptídeos polimerizados .....	32
4.11.1.	Gel SDS-PAGE .....	32
4.11.2.	Método de coloração pela Prata .....	32
4.12.	Animais de experimentação.....	33
4.13.	Esquemas de imunização .....	33
4.14.	Infecção desafio.....	34
4.15.	Isolamento e cultura dos esplenócitos .....	34
4.16.	Dosagem de citocinas.....	35
4.17.	Avaliação da produção de anticorpos .....	36
4.18.	Quantificação de parasitas.....	37
4.19.	Análise estatística.....	38
5.	Resultados .....	40
5.1.	Purificação de IgGs de cães infectados e reatividade frente aos antígenos de <i>L. chagasi</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> . .....	40
5.2.	Reatividade dos clones de fagos após os três ciclos de seleção. ....	40
5.3.	Seleção individual dos clones de fagos .....	42
5.4.	Especificidade dos clones positivos frente às imunoglobulinas purificadas de cães saudáveis. ....	42
5.5.	Especificidade dos clones positivos frente às IgGs de cães com doença de Chagas. ...	45
5.6.	Seqüenciamento dos clones positivos .....	46
5.7.	Imunoenaios com os peptídeos ligados à membrana .....	46
5.8.	Síntese e purificação dos peptídeos em fase sólida.....	47

5.9.	Análise por eletroforese em gel de policrilamida dos peptídeos polimerizados .....	48
5.10	Desenvolvimento de lesão e carga parasitária nos animais imunizados e desafiados com <i>L. amazonensis</i> .....	48
5.11	Perfil da resposta imune celular e humoral em camundongos BALB/c imunizados, antes e depois a infecção desafio com <i>L. amazonensis</i> .....	52
6	Discussão .....	63
7	Conclusões.....	70
8	Perspectivas .....	72
9	Referências bibliográficas .....	74



## Lista de Figuras

- Figura 01- ELISA de reatividade cruzada de antígenos de *Leishmania* spp.** Sensibilização com 5 µg/ml de antígenos de *Leishmania chagasi*, *L. amazonensis* e *L. major* e incubação com diluições seriadas de IgG anti-*L.chagasi*. 40
- Figura 02- Reatividade dos fagos nos pannings 1, 2 e 3.** Sensibilização com 10 µg/ml de IgG policlonal anti-*L. chagasi* e incubação com  $1 \times 10^{10}$  fagos eluídos dos pannings 1,2 e 3 40
- Figura 03- ELISA tipo sanduíche para a individualização dos clones específicos.** Sensibilização com 5 µg/ml de IgG policlonal anti-*L. chagasi* e incubação com 50 µl do sobrenadante de cultura de bactérias K91 contendo fagos de interesse e no controle negativo 50 µl de sobrenadante de cultura de K91 infectado com fagos silvestres. 42
- Figura 04-Especificidade dos clones positivos frente às IgGs normais.** Sensibilização com 10 µg/ml de IgG de cães saudáveis e incubada com 50 µl de sobrenadante de bactérias K91 com os fagos de interesse. Como controle positivo, a placa foi sensibilizada com o pool de IgG anti-*L. chagasi* e incubada com 50 µl do sobrenadante de um dos fagos selecionados. 43
- Figura 05- Especificidade dos clones positivos frente às IgGs de cão anti-*T. cruzi*.** Sensibilização com 50 µl de sobrenadante de cultura de K91 infectada com os fagos selecionados e incubação com 10 µg/ml de IgGs de cães chagásicos. 44
- Figura 06- Análise da reatividade dos peptídeos sobre membrana de celulose com pool de soros positivos e negativos.** Os soros foram usados na diluição 1:250. Foi empregado anticorpo anti-IgG de cão conjugada à peroxidase diluído 1:500. 45
- Figura 07- Perfil de eluição dos peptídeos sintéticos em coluna de fase reversa C18 em sistema HPLC** 46
- Figura 08- Análise, por espectrometria de massa, dos picos purificados com massa estimada em 1886 Daltons (Da).** 47
- Figura 9: Eletroforese dos peptídeos polimerizados, SDS-PAGE 10% corado pela prata.** Uma alíquota de 20 µl foi separada em gel de policrilamida 15% em condições não redutoras e posteriormente corada pela prata. Canaleta (A) 10 µg de polímero 11 H e 12 A; canaleta (B) 5µg Padrão de peso molecular. 48

**Figura 10- Avaliação do tamanho médio das lesões nas patas infectadas de camundongos BALB/c imunizados com o polímero, após a infecção desafio com *L. amazonensis*.** A) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante e C3= grupo de animais imunizados com o polímero 11 H e 12 A mais adjuvante. B) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3=Grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12 A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mais adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11 H mas adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12 A mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA mais adjuvante

49

**Figura 11- Quantificação de parasitas nas patas infectadas de camundongos BALB/c imunizados com peptídeos sintéticos, após 8 a 9 semanas da infecção desafio com *L. amazonensis*.** A) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3= grupo de animais imunizados com o polímero 11 H e 12 A mais adjuvante. B) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3=Grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12 A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mais adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11 H mas adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12 A mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA mas adjuvante. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste t-student).

50

**Figura 12- Produção de IFN- $\gamma$  pelos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados, após a infecção desafio com *L. amazonensis*.** A) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante e C3= grupo de animais imunizados com o polímero 11 h e 12 A mais adjuvante. B e C) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3=Grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12 A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mas adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11H, mas adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12 A, mas adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA, mas adjuvante. Sensibilização com 50  $\mu\text{g/ml}$  de SLALA ou 10  $\mu\text{g/ml}$  do polímero e incubação com sobrenadante de cultura de esplenócitos (100  $\mu\text{l}$ ). \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste t-student).

53

**Figura 13- Produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com o polímero, antes e após a infecção desafio com *L. amazonensis*.** A e B) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3= grupo de animais imunizados com o polímero 11 H e 12 A mais adjuvante. C, D, E e F) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3=Grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12 A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mais adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11H, mais adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12 A, mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA, mais adjuvante. Sensibilização com 50 µg/ml de SLALA ou 10 µg/ml do polímero e incubação com sobrenadante de cultura de esplenócitos (100 µl). \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste t-student).

56

**Figura 14- Produção de IgG total, IgG1 e IgG2a em amostras de soro de camundongos BALB/c imunizados com o polímero e SLALA, antes e após a infecção desafio.** C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3= grupo de animais imunizados com o polímero dos peptídeos 11 H e 12 A mais adjuvante , C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mais adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11H, mais adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12 A, mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA, mais adjuvante. Sensibilização das placas de ELISA com 0,5 µg/ml do polímero dos peptídeos 11 H e 12 A (A e C) ou com 1,0 µg/ml de SLALA (B e D) e incubação com amostras de soro de camundongos, na diluição de 1:100. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste t-student).

61

## Lista de Abreviaturas

<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
<b>BSA</b>	Soro albumina bovina
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>Con A</b>	Concavalina A
<b>DIPC</b>	Diisopropilcabodiimida
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>Fmoc</b>	Fluorenil metil oxicarbonila
<b>g</b>	Gramas
<b>HOBt</b>	Hidroxibenzotriazo
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>ICB</b>	Instituto de Ciências Biológicas
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-12</b>	Interleucina 12
<b>IL-4</b>	Interleucina 4
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-12R</b>	Receptor da interleucina 12
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>L</b>	Litro
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Normal
<b>nm</b>	Nanometro
<b>ng</b>	Nano grama
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Difosfato de sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sódio
<b>OPD</b>	o-fenilenodiamina
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>RIFI</b>	Reação de Imuno fluorescência indireta
<b>RPM</b>	Rotações por minuto

**SLALA** Extrato antigênico solúvel de *L. amazonensis*  
**SLcAE** Extrato antigênico solúvel de *L. chagasi*  
**TFA** Ácido trifluoracético  
**Th1** Linfócito T helper  
**TNF- $\alpha$**  Fator de necrose tumoral alfa  
**SDS** Dodecil sulfato de sódio  
**UFMG** Universidade Federal de Minas Gerais

## **Abstract**

*Leishmania amazonensis* is one of the major etiologic agents of a broad spectrum of clinical forms of leishmaniasis and has a wide geographical distribution in Americas, which overlaps with the areas of transmission of many other *Leishmania* species. In this work, the protective efficacy induced by immunization with a polymer originated from two synthetic peptides selected by Phage Display and Spot-Synthesis techniques was evaluated in BALB/c mice against *L. amazonensis* challenge infection. Phage-displayed peptides were screened using IgGs antibodies purified from serum samples of dogs with active visceral leishmaniasis. Three clones were found to interact with antibodies and the corresponding synthetic peptides were synthesized by the Spot-Synthesis method on cellulose membrane. In the screening using the peptides, two of them (named 11H and 12A) were recognized in Spot-ELISA and, synthesized in their soluble form, covalently conjugated with glutaraldehyde originating a polymer of approximately 30 kDa and these was used as immunogen. Immunization with polymer was able to induce a Th1 immune response prior to infection. After challenge infection, a sustained IFN- $\gamma$  production, low levels of IL-4, IL-10 and specific anti-parasite antibodies were detected in this mices. In contrast, mice of the control groups displayed low levels of IFN- $\gamma$  and high levels from IL-4, IL-10 and specific anti-parasite antibodies. We concluded that the use of synthetic peptides can be an alternative approach to generate vaccines against American Tegumentary Leishmaniasis.

## Resumo

*Leishmania amazonensis* é um dos principais agentes etiológicos em um amplo espectro de formas clínicas de leishmanioses e apresenta ampla distribuição geográfica nas Américas, que coincide com áreas comuns de transmissão de outras espécies de *Leishmania*. Neste trabalho, a eficácia protetora induzida pela imunização com o polímero formado por dois peptídeos sintéticos selecionados pelas técnicas de *Phage Display* e *Spot synthesis* foi avaliada em camundongos BALB/c contra a infecção-desafio com *L. amazonensis*. Os peptídeos foram selecionados utilizando anticorpos da classe IgG purificados a partir de uma mistura de amostras de soro de cães com leishmaniose visceral. Foram obtidos três clones de bacteriófagos expressando peptídeos de interesse que apresentaram maior especificidade em relação aos anticorpos IgGs purificados. Os peptídeos sintéticos foram sintetizados pelo método de *Spot synthesis* (técnica de síntese química de peptídeos em membranas de celulose) e testados em experimentos de screening. Dois peptídeos (denominados de 11H e 12A) foram reconhecidos pela técnica de *Spot synthesis* e foram sintetizados nas suas formas solúveis; em seguida, foram conjugados covalentemente com glutaraldeído, originando um polímero de aproximadamente 30 kDa e nesta forma, usados como imunógeno. A imunização com o polímero foi capaz de induzir uma elevada resposta imune Th1 antes da infecção. Após o desafio, uma produção elevada de IFN- $\gamma$ , baixos níveis de IL-4, IL-10 e anticorpos específicos ao parasita foram observados nestes animais. Em contraste, camundongos dos grupos controle exibiram baixos níveis de IFN- $\gamma$  e níveis elevados de IL-4, IL-10 e anticorpos anti-parasita. Dessa forma, o polímero composto pelos dois peptídeos mostrou-se como um bom candidato à vacina contra a Leishmaniose Tegumentar Americana.

# Introdução

---



## **1. Introdução**

As leishmanioses são consideradas doenças endêmicas em cerca de 88 países no mundo distribuídos em cinco continentes – África, Ásia, Europa, América e Oceania - com um total de 350 milhões de pessoas expostas aos riscos de infecção. Acredita-se que 12 milhões de pessoas sejam clinicamente afetadas pela doença e que 1,5 a 2,0 milhões de novos casos ocorram a cada ano. Deste montante, 1,0 a 1,5 milhões correspondem a casos de leishmaniose tegumentar e cerca de 500 mil de leishmaniose visceral. Dessa forma, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou as leishmanioses como uma das seis doenças endêmicas mais importantes no mundo (OMS, 2007).

Em modelos murinos, após a cura da leishmaniose cutânea causada pela espécie *Leishmania major*, os animais adquirem imunidade contra a re-infecção. Tal fato tem estimulado experimentos visando o desenvolvimento de vacinas que possam atuar no controle da infecção (Scott et al., 1987; Guimarães et al., 1996; Reed & Campos-Neto, 2003). Preferencialmente, antígenos vacinais devem ser compartilhados por diferentes espécies do parasita e imunogênico na maior parte delas, para ofertarem proteção cruzada, ou heteróloga, entre diferentes espécies de *Leishmania* (Beyrodt, et al, 1997).

Vacinas utilizando peptídeos sintéticos, que são capazes de induzir imunidade celular, são a grande promessa na prevenção e terapia de diversas doenças infecciosas (Van der Burg et al., 2006). Algumas vantagens na produção de peptídeos sintéticos correspondem à facilidade do manuseio técnico, pelo fato de não desenvolverem situações adversas, *in vivo*, tais como o potencial de integração ou de recombinação gênica com o DNA do hospedeiro mamífero, além da não exposição de seqüências deletérias da proteína de origem; são quimicamente estáveis não necessitando de condições especiais de armazenamento e apresentam-se livres de contaminantes virais ou bacterianos (Jackson, et al., 2006). Vacinas usando peptídeos sintéticos vêm sendo testadas experimentalmente em protocolos de vacinação contra alguns patógenos (Lindeberg, 1999; Harlow, et al., 1988; Thompson, et al., 1994).

A tecnologia que utiliza a expressão de peptídeos na superfície de fagos, denominada *de phage display*, apresenta-se como uma nova alternativa na busca de novos antígenos para seu uso em vacinas em diversas doenças. Esta técnica permite a seleção de peptídeos que são expressos na superfície de fagos filamentosos (neste trabalho foram usados fagos da classe M13), através da ligação individual a uma determinada molécula alvo e, conseqüentemente, de uma ligação de alta afinidade (Yu & Smith, 1996).

A principal vantagem desta técnica é a ligação direta e de elevada especificidade que ocorre entre a superfície do fago e a molécula alvo. Assim, é possível realizar a seleção de epitopos e mimotopos com potencial para serem usados como antígenos vacinais ou no imunodiagnóstico de várias doenças.

Juntamente com a técnica de *phage display*, a técnica de síntese química de peptídeos em membranas de celulose (denominada de *spot synthesis*) representa uma metodologia complementar para a construção de epitopos e mimotopos identificados por *phage display* (Hohne et al., 1993; Ferrieres et al., 1998; Liu et al., 1999). Um grande número de peptídeos pode ser sintetizado e testado simultaneamente para identificar e caracterizar os sítios de ligação de interesse.

Neste trabalho, foram utilizados anticorpos da classe IgG purificados de soros de cães com leishmaniose visceral, para selecionar peptídeos, usando-se as técnicas *de phage display e spot synthesis*. Após a síntese química dos peptídeos predefinidos, estes foram polimerizados e usados como antígenos para induzir resposta imune protetora em camundongos BALB/c contra a infecção experimental por *L. amazonensis*.

# Revisão da Literatura

---

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1. Agente etiológico**

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitas pertencentes ao Sub-Reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas morfológicas distintas: a promastigota, forma flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e a amastigota, sem flagelo e que é encontrada no hospedeiro mamífero.

### **2.2. Vetor**

São insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e do Gênero *Lutzomyia* nas Américas, neste caso, conhecidos popularmente como *mosquito palha*, tatuquira, birigui, dentre outros. Há de se destacar que apenas as fêmeas têm hábitos hematófagos e são capazes de transmitir o parasita ao hospedeiro mamífero (Grimaldi & Tesh, 1993).

### **2.3. Hospedeiros**

Já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres. Com a urbanização da doença, cães domésticos tornaram-se importantes reservatórios do parasita.

## **2.4.Ciclo Biológico**

Após uma refeição de sangue proveniente do hospedeiro mamífero infectado, formas amastigotas existentes dentro de células fagocíticas, tais como os macrófagos, no intestino do vetor, desenvolvem-se em formas alongadas, flageladas e móveis denominadas de promastigotas procíclicas. Há, então, um processo denominado de metacicloênese, no qual essas formas extracelulares, altamente replicativas e não infectivas diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, essas, sem capacidade replicativa, mas altamente infectivas, que são as responsáveis pela infecção do hospedeiro vertebrado. O vetor, agora contaminado, no momento de uma nova refeição injeta, junto com sua saliva, algumas centenas de formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro mamífero. Os parasitas são, na sua maioria, fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans, onde são formados os fagossomos, que se fundem a lisossomos, formando os fagolisossomos que originam os vacúolos parasitóforos. Dentro destas organelas, há a diferenciação das promastigotas em amastigotas. Essas formas aflageladas, parasitas intracelulares obrigatórios, são altamente infectivas e responsáveis pelo desenvolvimento da doença no hospedeiro mamífero (Grimaldi et al., 1989; Sacks, 2001).

## **2.5.Epidemiologia**

A Leishmaniose Visceral (LV) apresenta um amplo espectro epidemiológico no mundo, ocorrendo em diversas áreas tropicais e subtropicais. É encontrada principalmente nas Américas, desde a Argentina até os Estados Unidos (Grimaldi, *et al.*, 1989). É considerada endêmica em 88 países (21 no Novo Mundo e 67 no Velho Mundo), com cerca de 90% de casos notificados em países subdesenvolvidos como Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão (Monteiro *et al.*, 1994). Nesses países, a doença pode se apresentar como uma zoonose ou antroponose.

No Brasil, a LV é considerada uma zoonose e há a ocorrência anual de 2,0 a 3,0 mil casos. 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 tem 90% de todos os casos de LV que ocorrem no continente Americano. A região Nordeste é a que possui o maior número de casos (89%), seguida das regiões Sudeste (6%), Norte (4%) e, finalmente, da Centro-Oeste (1%) (Monteiro *et al.*, 1994).

O município de Belo Horizonte e sua região metropolitana são considerados, atualmente, como área endêmica da LV (Alves & Bevilacqua, 2004). A região convive, desde o ano de 1993, com uma epidemia de LV. 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 tem-se estabelecido em áreas urbanas e peri-urbanas, onde o vetor encontra boas condições 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 visceral canina (LVC) tem sido considerada mais importante do que a doença humana, visto apresentar uma maior prevalência e pelo fato de que muitos animais assintomáticos, residentes em áreas endêmicas da doença, podem estar contaminados e apresentar parasitos na pele (Marzochi *et al.*, 1985). A migração de cães infectados, acompanhando seus donos, também contribui para o alastramento da doença durante as migrações de pessoas para áreas não endêmicas (Arias *et al.*, 1996).

O controle da LVC ainda é feito através da eliminação dos cães infectados (Alencar, 1961), devido à ineficácia na terapêutica desta enfermidade.

## **2.6.Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento.**

A evolução clínica das leishmanioses é determinada, principalmente, pela espécie infectante do parasita e pelas características genéticas e pela imunidade inata e específica do hospedeiro mamífero (Muller et al., 1989; Homme et al., 1995).

As leishmanioses podem ser classificadas em duas grandes categorias clínicas: a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral.

A leishmaniose tegumentar compreende três formas clínicas: a cutânea, a forma mais comum da doença, que se caracteriza pela presença de uma lesão única nos pacientes e é causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. lainsoni* e *L. guyanensis*; a forma mucocutânea, uma forma debilitante da doença e que pode evoluir a lesões desfigurantes; é causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* e a forma cutânea difusa, uma forma anérgica e que se caracteriza pela presença de lesões disseminadas em diversas regiões do corpo, sendo associadas a uma fraca resposta celular e é causada pelas espécies *L. mexicana*, *L. venezuelensis* e *L. amazonensis* (Raso&Genaro, 1994; Kane & Mosser, 2000; Ashford, 2000; Weigle & Saraiva, 1996; Grimaldi & Tesh, 1993).

A doença causada pela espécie *L. amazonensis* é, normalmente, uma zoonose, na qual vetores e reservatórios são silvestres. Além do Brasil, é também encontrada na Bolívia, Peru, Equador, El Salvador, Colômbia, Venezuela, Panamá e Guiana Francesa (Weigle & Saraiva, 1996).

Várias formas clínicas de leishmanioses podem ser causadas por *L. amazonensis*, sendo as mais comuns as formas cutânea e cutânea difusa (Garcez et al., 2002). Paralelamente, Abreu-Silva et al. (2004) demonstraram que camundongos BALB/c desafiados com *L. amazonensis* apresentaram manifestações patológicas similares às encontradas na leishmaniose visceral causada por *L. infantum*.

Nas lesões causadas por *L. amazonensis*, macrófagos são encontrados muito parasitados, abrigando um grande número de amastigotas no interior dos vacúolos parasitóforos. As lesões, normalmente, não apresentam cura espontânea e o paciente necessita de tratamento quimioterápico. A ocorrência de recidivas é comum e a

resposta imune frente ao parasita não é eficaz para o controle da infecção (Antoine et al., 1990; Prina et al., 2003).

A leishmaniose visceral é a forma mais agressiva da doença que, invariavelmente, causa o óbito ao paciente, caso o mesmo não seja tratado. No Brasil, é também conhecida com o nome de calazar. Pode ainda, após o tratamento realizado, causar recidivas ou evoluir à forma clínica de leishmaniose dérmica pós-calazar.

O diagnóstico das leishmanioses é realizado, inicialmente, com base nas características clínicas que o paciente apresenta, associado à anamnese, na qual os dados epidemiológicos são de grande importância. Análises microscópicas de aspirados de lesões ou de cortes histológicos em lâminas, a inoculação de aspirados de tecidos infectados em hamsters e a cultura de fragmentos de tecidos são os métodos mais utilizados no diagnóstico definitivo (Ferreira et al., 2003; Tavares et al., 2003).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) tem-se mostrado como uma opção útil de diagnóstico, principalmente, em função da sua grande sensibilidade, sendo possível identificar o gênero do agente etiológico, a partir do material clínico obtido para a realização dos testes parasitológicos convencionais, entretanto, não apresenta condições de ser aplicada em triagens de campo.

Outros testes, tais como a eletroforese de enzimas e o uso de anticorpos monoclonais podem ser utilizados na identificação da espécie infectante (Grimaldi & Tesh, 1993). Entre os métodos imunológicos, o teste intradérmico de Montenegro, que avalia a resposta celular, é o mais utilizado no Brasil. Entre os métodos sorológicos, a RIFI, a ELISA e o teste de aglutinação direta são os mais usados.

O tratamento clínico das leishmanioses baseia-se na aplicação de compostos antimoniais pentavalentes, dos quais o Pentostan® (estibogliconato de sódio) e Glucantime® (N-metil antimoniato de meglumina) são os mais usados. Entretanto, tais fármacos causam toxicidades renal, hepática e cardíaca; têm custo elevado e dificuldade de logística de administração, haja vista terem de ser administrados por vários dias ininterruptamente, dessa forma, o paciente, na maioria das vezes, inicia o tratamento, mas não o completa.

Pelas dificuldades inerentes ao tratamento da doença, pelo aumento do número de casos de resistência do parasita e de recidivas, o controle da transmissão



do parasita pode constituir-se em uma alternativa importante. Há também, a capacidade de adaptação do parasita que, mesmo na ausência de seu reservatório natural, pode sobreviver em outros hospedeiros presentes em seu habitat (Desjeux, 1992; Kamhawi, 2000).

## **2.7.Resposta Imune**

Os estudos envolvendo os mecanismos de resposta imune nas leishmanioses são realizados, normalmente, em modelos murinos, na tentativa de se identificarem os fatores responsáveis pelos fenótipos de resistência e susceptibilidade a infecção pelo parasita *Leishmania* (Launois et al., 1996).

A resistência do hospedeiro mamífero é associada à ativação seletiva e à diferenciação das células T helper CD4+ efectoras, que se diferenciam em células Th1 produtoras de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), dentre outras. Por outro lado, a suscetibilidade ao parasita é relacionada com a resposta imune Th2, por meio de células T produtoras de citocinas tais como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), dentre outras (Launois et al., 2002; Peters & Sacks, 2006; Sher & Coffman, 1992).

A infecção experimental de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* apresenta características diferentes em relação aos fatores envolvidos nos fenótipos de resistência e susceptibilidade à espécie *L. major*. O parasita *L. amazonensis* desencadeia uma infecção crônica, sem cura espontânea, em linhagens de camundongos resistentes a outras espécies de *Leishmania* (Soong et al., 1997; Jones et al., 2000).

Jones et al. (2000), utilizando camundongos C3H/HeN, demonstraram que a suscetibilidade de camundongos BALB/c à *L. amazonensis* ocorre devido a ausência do receptor da IL-12 (IL-12R) na população de LT CD4+ e que essa inibição era independente da presença de níveis elevados de IL-4. Assim, a suscetibilidade à infecção estaria relacionada com a incapacidade do hospedeiro em montar uma

resposta imune Th1 eficiente, ao invés da existência de uma resposta imune Th2 exacerbada (Afonso & Scott, 1993).

A ativação policlonal de linfócitos B (LB) resulta na produção de anticorpos que reconhecem especificamente antígenos do parasita. Anticorpos contra *Leishmania* parecem ter pouca ou nenhuma importância na proteção contra a infecção (Jaffe, 1999).

Anticorpos da classe IgG participam do processo de adesão e fagocitose das promastigotas infectantes ao macrófago, sem ativar a explosão oxidativa, por meio de receptores para a porção Fc dos anticorpos (Peters et al., 1995), além de serem capazes de inibir a produção de citocinas importantes, tais como IFN- $\gamma$ , TNF-alfa e IL-12, bem como induzir a produção de IL-10 e TGF-beta pelos macrófagos parasitados. Dessa forma, um *milieu* de citocinas antiinflamatórias se estabelece e inibe o desenvolvimento de uma resposta Th1, favorecendo o desenvolvimento da doença (Kane & Mosser, 2001).

Kima et al., (2000) demonstraram que o curso da infecção com *L. amazonensis* é limitado na ausência de anticorpos circulantes e que infecções em camundongos deficientes do receptor Fc de macrófagos também resultam em lesões limitadas, mesmo em camundongos geneticamente suscetíveis a infecção por esta espécie de parasita. Wanasen et al.(2008) sugerem que LB e anticorpos possam favorecer a infecção por *L. amazonensis* promovendo a proliferação de células B e a migração celular ao lugar da infecção.

As proteínas do sistema de complemento, principalmente o C3 e seus produtos de clivagem (C3b, C3bi e C3dg), favorecem a fagocitose, uma vez que macrófagos possuem receptores específicos para os mesmos (CR1, CR2, CR3 e CR4). O complexo lítico final do complemento (C5-9) é capaz de se aderir à superfície das promastigotas e provocar a lise dessas formas. Entretanto, os lipopolissacarídeos (LPS) dos parasitos interferem na inserção do complexo C5-9, provavelmente, por impedimento estérico. A glicoproteína gp63 e alguns carboidratos (fucose e manose) também estão envolvidos com a ligação do parasito com a célula hospedeira (Sacks & Kamhawi, 2001).

A penetração na célula por meio de receptores para estes ligantes resulta em uma forma de escape do parasita, uma vez que, dessa forma, o mecanismo microbicida dos macrófagos não é ativado. Espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio e o óxido nítrico (NO) são os principais responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos. O NO é produzido nos macrófagos a partir da L-arginina em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). Citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estimulam a expressão da iNOS; já a IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  inibem a sua expressão. No interior dos vacúolos parasitóforos, as promastigotas se citodiferenciam em amastigotas, que sobrevivem e se multiplicam, dando início à doença.

A saliva do vetor contribui efetivamente na infectividade das formas promastigotas, por meio de substâncias vasodilatadoras. Estas substâncias, com funções imunossupressoras parecem inibir a apresentação de antígenos do parasita pelos macrófagos. Além disso, exercem um papel imunomodulador da resposta imune Th1, inibindo a produção e secreção de citocinas, tais como a IL-12 e o IFN- $\gamma$ , favorecendo a progressão da infecção (Sacks & Kamhawi, 2001).

### **2.8.A Técnica de *phage display*: expressão de peptídeos na superfície de fagos**

*Phage Display* é uma técnica de seleção de peptídeos *in vitro* na qual uma proteína ou peptídeo é geneticamente fundido a proteínas de superfície de um bacteriófago filamentosos, 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 (Smith, 1985).

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 á

partir da biblioteca através da ligação com uma molécula imobilizada em uma superfície e a seqüência do peptídeo selecionado pode ser deduzida da seqüência do DNA do fago (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 o número de formas representadas na biblioteca, mais facilmente será encontrado um ligante específico (Posner *et al.*, 1994).

A partícula viral do bacteriófago M13 é composta por cinco proteínas estruturais denominadas de P3, P6, P7, P8 e P9. No fago selvagem, encontram-se cerca de 2.800 cópias da P8. 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.

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 o imunodiagnóstico ou no desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças, na tentativa de se identificar seqüências específicas que se liguem a anticorpos presentes em tais amostras. Tal procedimento pode gerar o desenvolvimento de novos compostos mais simples e sensíveis, além de permitir o entendimento da participação de antígenos conhecidos, ou não, nos mecanismos de resposta imune (Manoutcharian, *et al.*, 1999).

Essa técnica demonstra um grande potencial na seleção e identificação de antígenos reconhecidos pelas amostras de soro de cães com LV, sem o prévio conhecimento de tais antígenos. Além disso, mostra-se como uma interessante alternativa a ser verificada no desenvolvimento de antígenos vacinais contra as leishmanioses.

# Objetivos

---

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a proteção induzida pela imunização com peptídeos sintéticos selecionados pelas técnicas de *phage display* e *spot synthesis*, em camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Leishmania amazonensis*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Purificar anticorpos da classe IgG a partir de amostras de soro de cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*.
- Selecionar peptídeos expressos na superfície de bacteriófagos utilizando os anticorpos IgGs purificados, por meio da técnica de *phage display*.
- Extrair e seqüenciar o DNA dos bacteriófagos que expressarem os peptídeos que apresentam reatividade frente aos anticorpos específicos.
- Sintetizar, quimicamente, em membranas de celulose (*spot synthesis*) e na forma solúvel, os peptídeos selecionados.
- Realizar a ligação dos peptídeos selecionados com glutaraldeído.
- Avaliar o perfil da resposta imune celular (produção de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) e humoral (IgG total, IgG1 e IgG2a) em camundongos induzidas pela imunização com os peptídeos sintéticos nos animais, antes da infecção desafio com *L. amazonensis*.

## *Objetivos*

- Avaliar a eficácia de proteção induzida nos animais imunizados com os peptídeos sintéticos e posteriormente desafiados com *L. amazonensis*, por meio da medição das lesões desenvolvidas, da carga parasitária e da resposta imunológica após a infecção desafio.



# Material e Métodos

---

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Parasitas**

As amostras IFLA/BR/1967/PH-8 de *Leishmania amazonensis* e MHOM/BR/1970/BH46 de *L. chagasi* foram gentilmente cedidas pela Profa. Maria Norma Melo do Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG).

Os parasitas foram cultivados em meio Schneider's completo, o qual foi constituído pelo meio Scheneider's (SIGMA) acrescido com 20 % de soro fetal bovino (SIGMA) inativado, 20 miliMolar (mM) de L-glutamina, 50 microgramas por mililitro ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de gentamicina, 200 unidades por mL de penicilina e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomicina, em pH 7,4.

Os parasitas permaneceram em cultivo a 24°C, sendo que repiques das culturas foram efetuados de cinco em cinco dias, períodos nos quais os parasitas apresentam-se em fase logarítmica de crescimento. Estoques de parasitas foram congelados em glicerol estéril, na concentração de 20%, diluídos em um mL de meio Schneider's completo e armazenados em nitrogênio líquido (-196C).

### **4.2. Preparação de extratos protéicos solúveis de *Leishmania***

As amostras de *L. chagasi* e *L. amazonensis* foram cultivadas em meio de cultura Schneider's completo e incubadas a 24°C. Decorridos cinco dias de cultivo e sendo constatadas a viabilidade e a ausência de agentes contaminantes, as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram quantificadas em câmara de Neubauer, sendo ajustadas para a concentração de  $2 \times 10^8$  promastigotas por mL.

Para o preparo do extrato solúvel de formas promastigotas de *L. chagasi* (ScLAE) e de *L. amazonensis* (SLALA), os parasitas foram recuperados por centrifugação a 2900 G (centrífuga modelo CT5000R Cientec) por 20 minutos (min) e lavados em salina tamponada com fosfato (PBS, o qual foi constituído por 8,0 gramas

(g) de NaCl; 1,16 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e de 0,2 g de KCl, para 1 litro (L) em água destilada pH 7,4) estéril por 4 vezes. O sedimento foi ressuspenso em cinco mililitros (mL) de PBS estéril e submetido a seis ciclos de choque térmico, com congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C.

A fração antigênica solúvel foi coletada após centrifugação (6000 G por 20 min) e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As amostras foram armazenadas em alíquotas a -80 °C até o momento do uso.

### **4.3. Amostras de soros de cães**

Os soros de cães com leishmaniose visceral (n=38) utilizados neste trabalho foram obtidos no 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.

O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) foi determinado através de testes ELISA, RIFI e pela confirmação da presença de parasitas observados em aspirados da medula óssea.

As amostras de soro de cães saudáveis (n=16), negativos para leishmanioses, foram obtidas do laboratório do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte e cedidos pela Dra. Eliane Lobato.

Amostras de soro de cães com doença de Chagas (n=10) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Yeso de Miranda Castro da Universidade Federal de Ouro Preto. Estes soros foram previamente testados por ELISA.

Foram realizadas a extração e purificação de imunoglobulinas da classe IgG anti-*L. chagasi*, de cães saudáveis e daqueles com doença de Chagas, para a seleção dos fagos específicos.

A extração das imunoglobulinas, da classe IgG, para a seleção de fagos específicos foi realizada de acordo com o protocolo da AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (1998), com algumas modificações, como descrito:

Uma solução de sulfato de amônio saturado (50% p/v) foi adicionado lentamente aos pools de soros (positivos, negativos e anti-Chagas) com auxílio de uma bureta. O volume adicionado de sulfato e soro foram os mesmos. A precipitação de imunoglobulinas ocorreu a 4° C por 12 horas, sob leve agitação. A mistura foi transferido para tubos Falcon (Nunc) de 50 ml e centrifugados por 30 minutos a 2.900 G 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 a completa retirada do sulfato de amônio.

Após a precipitação das imunoglobulinas totais com sulfato de amônio, as imunoglobulinas da classe IgG foram purificadas por cromatografia de imunoafinidade em coluna de proteína A-sepharose, como descrito por Chávez-Olortegui et al. (1994).

A concentração protéica das imunoglobulinas foi determinada por meio de leitura espectrofotométrica, com comprimento de onda de 260:280 nanômetros (nm).

#### **4.4. Teste ELISA para verificação da reatividade das IgGs purificadas**

Foram realizados ensaios imunoenzimáticos (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA*) para verificar a reatividade das IgGs de cão purificadas frente ao extrato solúvel de *L. chagasi* e *L. amazonensis*. A metodologia utilizada é descrita abaixo:

Os poços de uma microplaca de polietileno (Falcon) foram sensibilizados durante um período de 16 horas, a 4° C, com 100 µL/poço (volume padrão) de solução de tampão carbonato 0,02 M, pH 9,6, (tampão de sensibilização ou coating buffer) contendo o extrato solúvel de *L. chagasi* (1 µg/ml).

A placa foi lavada com solução de lavagem (PBS 1x 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 200 µL de solução de bloqueio (caseína 2% em PBS 1x 0.05M, pH 7.4) a 37°C durante 1 hora.

A placa foi lavada cinco vezes e, em seguida, foi realizada a reação com IgGs de cães anti-*L.chagasi* e normais diluídas em tampão de incubação (caseína 0.25% em PBS 1x 0.05M, pH 7.4 e 0.05% Tween 20), a 37°C durante 1 hora. As placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem. Foram adicionados 100 µL de tampão de incubação contendo a anticorpo anti-IgG total de cão conjugado à peroxidase (Sigma) diluído (1:1000), a 37°C durante 1 hora.

Os poços foram lavados seis vezes com solução de lavagem. A atividade enzimática foi revelada pela adição de 100 µL da solução reveladora (duas mg de OPD e 2 µL de peróxido de hidrogênio para 10 mL de tampão citrato 0,05 M pH 5,0).

A placa foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A interrupção da reação foi feita com 20 µL da 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 dos peptídeos expressos na superfície dos fagos (bio-seleção)**

Para a bio-seleção de moléculas capazes de se ligar especificamente às imunoglobulinas dos soros de cães com leishmaniose visceral (LV), foram utilizadas quatro bibliotecas expressando peptídeos aleatórios de 12, 15, 17 e 30 aminoácidos. As bibliotecas foram obtidas pelo Dr. J. Scott (Simon Fraser University, Burnaby BC, Canadá). Os fagos foram selecionados após três ciclos consecutivos de bio-seleção e amplificação, a fim de se aumentar a especificidade das ligações.

A bio-seleção foi feita de acordo com protocolo descrito por Smith (1985), com 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, na concentração de 100 µg/mL em coating buffer (NaHCO<sub>3</sub> 100mM pH 8,6), overnight a 4°C, sob leve agitação. Os anticorpos não ligados foram removidos por cinco lavagens de dois minutos cada

com solução de lavagem (TBS 50mM, NaCl 150mM, Tween 0.05%, pH 7.5). A placa foi bloqueada com a adição de 200 µL/poços 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 cada com solução de lavagem,  $5 \times 10^{12}$  fagos de cada biblioteca foram adicionados à 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 cada com NaCl/Tris (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.5) e cinco lavagens de dois minutos cada com solução de lavagem.

Os fagos ligados foram eluídos pela incubação com o respectivo competidor (no caso, o extrato protéico solúvel de *L. chagasi*, na concentração de 10µg/mL) em TBS (Tris 50mM, NaCl 150mM, Tween 0.05%, PH=7.5), overnight a 4°C, sob agitação.

A amplificação dos fagos eluídos foi iniciada com a adição destes em 5 mL de uma cultura de células de *Escherichia coli* K 91 (Densidade ótica a 550nm = 1.8) em meio LB, que se encontra em fase exponencial de multiplicação. Depois de uma incubação de 10 minutos a 37°C, as bactérias infectadas foram selecionadas com adição de tetraciclina ao meio (0.2 µg/mL de meio) por 30 minutos a 37°C, com agitação de 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 constante de 225 rpm para propagação.

As células foram lavadas com duas centrifugações (4000 em seguida 8000 rpm). Os fagos resultantes foram separados do sobrenadante por precipitação em 20% de polietileno glicol 8000 (PEG 8000 20% 2.5M NaCl), overnight, em banho de 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 30 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 15.000 rpm). O sobrenadante foi então armazenado a -20° C. Após a obtenção

dos fagos, estes foram titulados para se iniciar um novo ciclo de bio-seleção, com o objetivo de se 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, 200  $\mu$ L de uma cultura de *E. coli* em crescimento exponencial (Densidade ótica a 550nm = 1.8). Para aperfeiçoar a infecção, as células foram mantidas a 37° C por 15 minutos e a 37°C por mais 15 minutos com agitação de 225 rpm. O volume total de células (200  $\mu$ L) das diluições escolhidas foram plaqueados em meio LB ágar com tetraciclina (20 $\mu$ g/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 bio-seleção**

A fim de comprovar o aumento da afinidade dos fagos específicos às IgGs anti-*L. chagasi*, após o terceiro panning (P3), foi realizado um ensaio ELISA, conforme o protocolo descrito:

Uma placa para ELISA (Nunc) foi sensibilizada com IgGs do pool de soros de cães com LV, em uma concentração de 10  $\mu$ g/mL em coating buffer (NaHCO<sub>3</sub> 100mM pH 8,6), por 16 horas a 4°C.

O bloqueio dos sítios livres foi feito utilizando-se uma solução PBS-Tween 0,1%/ Leite *Molico* 2% durante 1 hora a 37° C. A cada poço, foram adicionados  $10^{10}$  fagos que foram eluídos de cada ciclo de seleção. Como controle negativo, a mesma concentração de fagos silvestres foi utilizada. A placa foi incubada por 2 horas a 37° C. Após, as cavidades foram lavadas seis vezes com PBS-Tween 0,1% e incubadas a 37° C durante 1 hora com o anticorpo anti-fago M13 conjugado à peroxidase (Sigma), diluído 1:5000. As cavidades foram lavadas novamente por 6 vezes com PBS-Tween 0,1% e reveladas com 100  $\mu$ L de solução reveladora (duas mg de OPD para 10 mL de tampão substrato (citrato trissódico, ácido cítrico e de água oxigenada 30 volumes).

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

#### **4.5.3. Screening dos clones de fagos selecionados**

Ao fim terceiro ciclo de bio-seleção, uma titulação foi realizada e colônias isoladas foram amplificadas para serem analisadas individualmente. As colônias foram transferidas, uma a uma, para uma placa de cultivo celular de 96 poços contendo 200 µL de meio LB mais 20 µg/mL de tetraciclina, permanecendo overnight a 37°C, com agitação de 225 rpm. A placa foi centrifugada a 1500 rpm por 30 minutos e o sobrenadante da cultura, onde estão os fagos isolados, foi testado por meio da técnica de ELISA, como descrita abaixo:

Uma placa para ELISA (Nunc) foi sensibilizada com imunoglobulinas do pool de soros de cães com LV em uma concentração de 10 µg/mL em tampão de sensibilização (coating buffer), overnight a 4° C.

O bloqueio dos sítios livres foi feito utilizando-se solução de bloqueio, durante 1 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, acrescidos de 50 µL da solução de bloqueio. A placa foi incubada por 1 hora a 37° C.

Após, as cavidades foram lavadas 6 vezes com PBS-Tween 0,1% e incubadas a 37°C durante 1 hora com anticorpo anti-fago M13 conjugado à peroxidase diluído 1:5000. As cavidades foram lavadas 6 vezes com PBS-Tween 0,1% e reveladas com 100 µL de solução reveladora. A interrupção da reação foi feita com 20 µL de solução de ácido sulfúrico (2 N) e a leitura espectrofotométrica feita a 492nm.

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



#### **4.5.4. Especificidade dos clones positivos frente às IgGs de cães saudáveis**

Com o objetivo de se selecionar apenas clones com alta especificidade contra anticorpos purificados anti-*L. chagasi* foi feito ELISA utilizando-se soros de cães saudáveis.

#### **4.5.5. Teste de reação cruzada dos clones positivos frente às IgGs de cães com doença de Chagas**

Com o objetivo de selecionar apenas clones com elevada especificidade em relação aos anticorpos anti-*L. chagasi* purificados, foram feitos ensaios ELISA utilizando-se anticorpos IgGs purificados a partir de amostras de soro de cães infectados com *Trypanosoma cruzi*.

#### **4.5.6. Sub-clonagem dos clones positivos**

Após os clones específicos terem sido caracterizados, 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), overnight a 37° C.

Uma colônia correspondente a cada clone positivo foi transferida para 5 mL de meio LB líquido com tetraciclina e submetida à agitação constante com 225 rpm, overnight, a 37° C. Após essa etapa, foi acrescentado 1 ml de glicerol estéril para congelamento e estoque das culturas de bactérias.

## **4.6. Seqüenciamento do DNA viral**

### **4.6.1. Extração do DNA**

Para extrair o DNA dos fagos selecionados, 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, foi adicionado 1 µL do DNA viral. Para comparação, foi utilizado um padrão de 250 ng de DNA.

### **4.6.3. Seqüenciamento automático capilar**

Após a dosagem, 250 ng de cada DNA foram submetidos ao seqüenciamento no aparelho *ABI Prism- 310 Genetic Analyser (Perkim Elmer)*.

### **4.6.4. Identificação dos peptídeos selecionados**

Para identificação dos peptídeos selecionados, primeiramente, as seqüências de nucleotídeos codificadoras dos peptídeos foram identificadas, 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.

#### **4.6.5. Análise de homologia**

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

#### **4.7. Síntese e imunoenaios dos peptídeos em membranas de celulose**

Com a identificação das seqüências codificadoras dos peptídeos de interesse, os mesmos foram sintetizados sobre uma membrana de celulose pelo método de *spot synthesis* (Franck, 1992) e o ensaio realizado como descrito:

Após a síntese dos peptídeos sobre a membrana, para a verificação da reatividade dos mesmos em relação às amostras de soro de cães com LV, as membranas contendo os peptídeos foram lavadas três vezes com TBS 1x pH 7.4 e incubadas por 24 horas com solução de bloqueio em TBS, contendo Tween-20 a 0,05% (T-TBS) e sacarose a 0.5%, à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com os pools de soros de cães negativos e positivos para LV, por 90 min à 37°C.

Posteriormente, três lavagens foram realizadas e o anticorpo anti-IgG de cão conjugado à fosfatase alcalina foi adicionado e mantido sob agitação por 90 min. Foram realizadas duas lavagens com TBS/Tween 20 e outras duas subseqüentes com CBS pH 7,0 por 10 min e sob agitação constante, à temperatura ambiente, adicionou-se o substrato (MTT-BCIP, Sigma), permanecendo em incubação por 30 minutos. A reação foi interrompida depois de duas lavagens da membrana com o tampão CBS pH 7,0 para a visualização da reatividade dos spots de acordo com a formação de precipitado azul sobre os peptídeos (spots) mais reativos.

Ao final dos ensaios, 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 nas

proporções 50:40:10 vol/vol/vol), e metanol para remoção dos complexos moleculares precipitados sobre os peptídeos (três lavagens, de 10 min cada). Este procedimento permite a reutilização das membranas por cerca de 30 a 40 vezes para o emprego de anticorpos policlonais e de até 70 vezes para anticorpos monoclonais.

#### **4.8. Síntese química dos peptídeos em fase sólida – Método F-moc**

Os peptídeos selecionados foram sintetizados sob a forma solúvel, utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina), que usa aminoácidos especiais para a síntese *in vitro*. Esses aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc (fluorenil metil oxicarbonila) e são acoplados à resina, que também se encontra protegida.

O protocolo foi realizado conforme Merryfiel (1965), com algumas modificações: 54 mg da resina (Rink Amide-40  $\mu\text{M}$ ) foram colocados em um tubo de síntese e o seu grupamento Fmoc foi liberado, cobrindo a resina com 3 ml de piperidina 20% em DMF. A resina foi lavada três vezes, por 10 minutos cada, com a solução mencionada, sob 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 três vezes com 5 ml de DMF por lavagem. Iniciou-se, então, o acoplamento dos aminoácidos Fmoc. A quantidade despendida para cada aminoácido foi equivalente a 160  $\mu\text{M}$ . 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 colocado no tubo de síntese e, para cada 160  $\mu\text{M}$  do aminoácido foram acrescentados 21.6 mg de hidroxibenzotriazol (HOBt) e 25  $\mu\text{L}$  de diisopropilcabodiimida (DIPC). 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 permaneceu sob agitação constante por 3 horas à 37°C. Após, todo o líquido do tubo de síntese foi retirado com auxílio de uma bomba a vácuo e a resina lavada com DMF por três vezes.

O grupamento amina desse primeiro aminoácido acoplado foi desprotegido lavando-se a resina com 3 ml de uma solução de piperidina 20% em DMF, por 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 fossem acoplados.

Após o término dos ciclos, o último aminoácido foi desprotegido como os anteriores e a resina lavada por 4 vezes, durante 5 minutos cada, com diclorometano. O peptídeo foi dissociado da resina pelo uso de uma solução de clivagem contendo 2.5% de  $\beta$ -mercaptoetanol e 2.5% de água, num volume final de 5 mL de TFA (ácido trifluoracético). O tubo de reação permaneceu sob agitação com a solução por 4 horas.

A solução contendo os peptídeos foi coletada 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 por três vezes a 3000 rpm por 30 minutos, enquanto o sobrenadante foi desprezado e o peptídeo ressuspensado em água.

Após a obtenção do peptídeo, este foi liofilizado, purificado em sistema de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e analisado em espectrômetro de massa.

#### **4.9. Purificação dos peptídeos sintéticos**

Os peptídeos sintetizados foram purificados por cromatografia em fase reversa utilizando-se a coluna Sephasil Peptide C18 – Shimadzu (volume 4.24 mL, diâmetro 0.46 cm e altura 15 cm) acoplada a sistema de HPLC. Primeiramente, a coluna foi lavada com a solução A (TFA 1.1% diluído em água), por 10 minutos. Os componentes presentes foram eluídos, utilizando-se um gradiente que variou entre 0 e 25% de acetonitrila durante 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 P.A.. Após a purificação, os peptídeos foram

submetidos à espectrometria de massa (Micromass Q-Tof- micro TM) e sua massa molecular foi confirmada.

#### **4.10. Polimerização dos peptídeos com glutaraldeído**

Os peptídeos sintéticos 11H e 12A foram acoplados utilizando-se uma solução de glutaraldeído a 1%. Este é capaz de interagir com as lisinas e o grupo amino das cisteínas formando uma ligação covalente. A ligação foi realizada como descrito por Machado de Ávila et al. (2004).

#### **4.11. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida dos peptídeos polimerizados**

##### **4.11.1. Gel de eletroforese SDS-PAGE**

Um gel em concentração de 15% de acrilamida (Laemmli, 1970) foi preparado para a migração do polímero dos peptídeos 11 H e 12 A em presença de 10% dodecil sulfato de sódio (SDS) em sistema BioRad. Utilizaram-se 10 e 20 µg, do polímero dos peptídeos. Estas amostras foram adicionadas ao tampão de amostra em condições não redutoras (Tris-HCl 0,5 mol/l, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v) e azul de bromofenol 0,1% (p/v)). A migração aconteceu utilizando-se tampão de migração (Tris 0,025 mol/l, glicina 0,2 mol/l e SDS 0,5% , pH 8.3) sob voltagem de 150 V.

##### **4.11.2. Método de coloração pela prata**

Para a coloração do gel, o método de coloração pela prata foi o adotado (Rabilloud, 1994). Após a migração do gel, este foi embebido durante 1 hora a temperatura ambiente em solução fixadora – Metanol: Acido Acético: Formaldeído (5:1.2: 0.004) em água. Após 3 lavagens de 7 minutos com água, foi adicionado ao gel uma solução de tiosulfato de sódio a 4% durante 1 minuto. Novamente, o gel foi submetido a 3 lavagens de 7 minutos com água para posterior incubação deste,

por 20 minutos, com a solução de prata (AgNO<sub>3</sub>- 0.1 g+ formaldeído 75 ul em 100 ml de água). A solução foi então incubada com a solução de desenvolvimento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 6g + Formaldeido 50 µl + sol. Tiosulfato de sódio 2ml em agua). Após o aparecimento das bandas, o gel foi colocado em contato com a solução de parada - Metanol: Acido Acético (5:1.2) em água.

#### **4.12. Animais de experimentação**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, de 4 a 6 semanas de idade. Os animais foram adquiridos junto ao Biotério do instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidas no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG.

#### **4.13. Esquemas de imunização**

Grupos de camundongos BALB/c (n=12, por grupo) foram imunizados com 50 µg do polímero peptídico, composto pelos peptídeos 11H e 12A, por via subcutânea. Quatro doses foram administradas em intervalo de 15 dias, em um volume final de 100 µl em PBS estéril, por animal. O adjuvante de Freund foi utilizado. Grupos de camundongos que receberam PBS, adjuvante de Freund, o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis* mais adjuvante, o polímero do peptídeo 11H mais adjuvante, o polímero do peptídeo 12A mais adjuvante e SLALA (50 µg) mais adjuvante, foram usados como controle.

#### **4.14. Infecção desafio**

Na infecção desafio, realizada 21 dias após a última dose da vacina, foram utilizadas  $1 \times 10^6$  promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. amazonensis*. Para tal, os parasitas foram cultivados em meio Schneider's completo a 24° C. Os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer e administrados no coxim plantar direito dos animais, em um volume final de 20 µl em PBS.

Após o desafio, o desenvolvimento da lesão foi monitorado por meio de leituras semanais da espessura da pata infectada, comparando-se com os valores obtidos na pata não-infectadas, de onde foi obtido o valor médio e o erro padrão dos grupos experimentais. A medição foi realizada com a utilização de um paquímetro (L.S. Starrett S.A., SP, Brasil).

Todos os experimentos foram repetidos por 2 vezes, com a obtenção de resultados similares.

#### **4.15. Isolamento e cultura dos esplenócitos**

Camundongos BALB/c imunizados e/ou desafiados foram sacrificados para a coleta do baço, o isolamento, a cultura e a estimulação dos esplenócitos. Para tal, um dia antes da infecção desafio e cerca de 8 a 9 semanas após, animais (n=4) foram sacrificados e o baço foi coletado para o cultivo das células esplênicas e a posterior análise de citocinas produzidas nos sobrenadantes das culturas.

Os órgãos foram macerados em meio de cultura Dullbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; SIGMA) completo, o qual foi constituído por meio DMEM acrescido de 20% de soro fetal bovino inativado, 4,5 g/L de glicose, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, pH 7,4 em placas de cultivo celular de 24 poços (Nunc). Após a maceração, procedeu-se à lavagem das células em meio DMEM incompleto e, em seguida, a lise de hemácias com tampão de lise (Tris HCl 17 mM pH 7,4 e Cloreto de amônio 144 mM), por 4 min. As células



viáveis foram recuperadas por centrifugação (1500 G por 10 min a 4 C) e ressuspensas em 1 mL de DMEM completo.

A seguir, as células foram contadas em câmara de Newbauer e ajustadas para uma concentração final de  $5 \times 10^6$  células por mL, sendo então diluídas em meio DMEM completo e plaqueadas em placas de 24 poços.

As concentrações utilizadas para os antígenos estimuladores das células, no caso, do polímero (11H-12A) e do extrato proteico solúvel de *L. amazonensis* (SLALA) foram as menores possíveis capazes de induzir a máxima produção das citocinas, definidas através de uma curva padrão de dose e resposta. Dessa forma, as concentrações utilizadas para cada antígeno foram de 10 µg/mL do polímero e de 50 µg/mL do SLALA. O mitógeno concavalina A (Con A) foi utilizado como controle de viabilidade celular, na concentração de 5 µg/mL.

Após o acréscimo dos antígenos, as placas foram incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas a 37°C. Após, os sobrenadantes foram coletados e utilizados nos experimentos de ELISA ou armazenados a -80°C.

#### **4.16. Dosagem de citocinas**

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

#### **4.17. Avaliação da produção de anticorpos**

O perfil da resposta humoral nos animais imunizados e/ou desafiados foi avaliado através da produção de anticorpos IgG total e das sub-classes IgG1 e IgG2a, específicos ao polímero ou ao SLALA.

Para tal, após a morte dos animais, cerca de 1 mL de sangue total foi retirado do plexo braquial. As amostras foram incubadas por 15 min a 37° C e, posteriormente, centrifugadas (1500 G por 15 min), para a obtenção de soro.

Os ensaios ELISA foram realizados em placas de 96 poços (Nunc), utilizando-se como antígenos sensibilizadores os peptídeos sintéticos polimerizados ou SLALA.

Curvas de titulação foram realizadas para se determinar a menor concentração possível dos antígenos a serem utilizados na sensibilização das placas, sem a alteração qualitativa dos resultados. Dessa forma, foram determinadas as concentrações de 0,5 µg/mL para os peptídeos sintéticos ou o polímero e de 1 µg/mL para o SLALA. Curvas de titulação com as amostras de soro foram também realizadas. Nesses casos, optou-se por uma diluição padrão de 1:100.

As placas foram sensibilizadas em tampão carbonato/bicarbonato (0,1M/0,05M, respectivamente, pH 9,6) e incubadas a 4°C por 16 horas. Em seguida, foram efetuadas 3 lavagens e a solução de bloqueio (PBS 0,15 M pH 7,4 e caseína a 2%) foi acrescentada, por 2 h a 37°C. Novamente, as placas foram lavadas por 3 vezes e as amostras de soro foram acrescentadas na diluição de 1:100, em duplicata, diluídas em tampão de incubação (PBS 0,15 M pH 7,4; caseína a 0,2% e Tween a 0,05%) e mantidas em repouso por 1 hora a 37°C.

Para a determinação de IgG total, as placas foram lavadas por 7 vezes e o anticorpo anti-IgG total de camundongo, conjugado a peroxidase, foi acrescentado na diluição de 1:10.000, em tampão de incubação, sendo mantidas por 2 horas a 37°C. Após 7 lavagens, a solução reveladora foi acrescentada. Essa foi composta por OPD a 0,02% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 volumes e 100 ml de tampão citrato fosfato 0,5 M (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 24 mM, ácido cítrico 17,5 mM para um litro de água destilada, pH 5,0).

As placas foram incubadas por 20 min, ao abrigo da luz, e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 N. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA (BioRad), com comprimento de onda de 492 nm.

Para a determinação dos isotipos IgG1 e IgG2a, após a incubação das placas com as amostras de soro e posterior lavagem, foram acrescentados os anticorpos anti-IgG1 (SIGMA) ou anti-IgG2a (SIGMA), respectivamente. Os anticorpos foram diluídos a 1:5.000 em tampão de incubação e as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C.

Após 7 lavagens, o anticorpo anti-IgG total de camundongo, conjugado a peroxidase, foi acrescentado na diluição na diluição de 1:5.000 em tampão de incubação. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e, após sucessivas lavagens, a solução reveladora foi acrescentada. A reação de revelação ocorreu no escuro, por 20 min e foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA a 492 nm. Em todos os ensaios, controles positivos e negativos foram utilizados.

#### **4.18. Quantificação de parasitas**

Ao final dos experimentos (cerca de 8 a 9 semanas após a infecção), a quantificação de parasitas foi realizada através da técnica de diluição limitante. Para tal, a carga parasitaria foi determinada após a morte dos animais e a remoção de fragmentos das bordas da lesão na pata infectada.

Os fragmentos foram pesados, homogeneizados em meio de Schneider's completo (proporção de 100 mg de tecido para 1 mL de meio de Schneider's) e macerados em triturador de vidro estéril. Esta suspensão foi plaqueada, em duplicata e diluições sucessivas foram realizadas até a ordem de grandeza logarítmica de 10<sup>-12</sup>, em placas de cultura de 96 poços (Nunc).

As placas foram incubadas por sete dias a 24°C, quando foram levadas ao microscópio ótico e o resultado final foi determinado pela maior diluição logarítmica na quais parasitas móveis podiam ser visualizados.

#### **4.19. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada pela obtenção das médias, dos desvios-padrão e erros-padrão. Os resultados obtidos foram comparados através do teste *t* de Student não-pareado, sendo consideradas significativas as diferenças de  $p < 0,05$ .

# Resultados

---

## **5. Resultados**

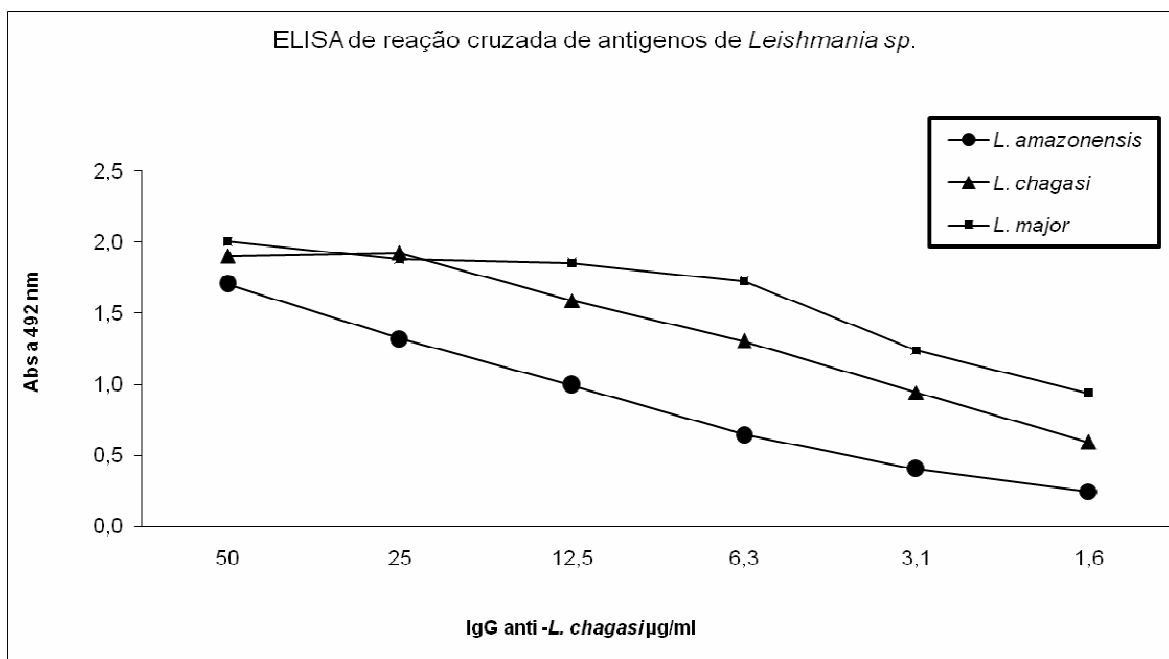
### **5.1. Purificação de IgGs de cães infectados e reatividade frente aos antígenos de *Leishmania chagasi*, *L. amazonensis* e *L. major*.**

Após a purificação dos anticorpos IgGs obtidos a partir do pool de amostras de soro de cães infectados com *L. chagasi*, um ensaio ELISA foi realizado para se verificar a reatividade das imunoglobulinas frente aos antígenos de *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. major*, uma vez que, para a seleção dos clones expressando os peptídeos de interesse, foram utilizados anticorpos de cães com leishmaniose visceral (LV) e, neste trabalho, os peptídeos sintetizados foram testados em experimentos de proteção contra *L. amazonensis*, uma espécie relacionada, principalmente, aos casos de leishmaniose tegumentar.

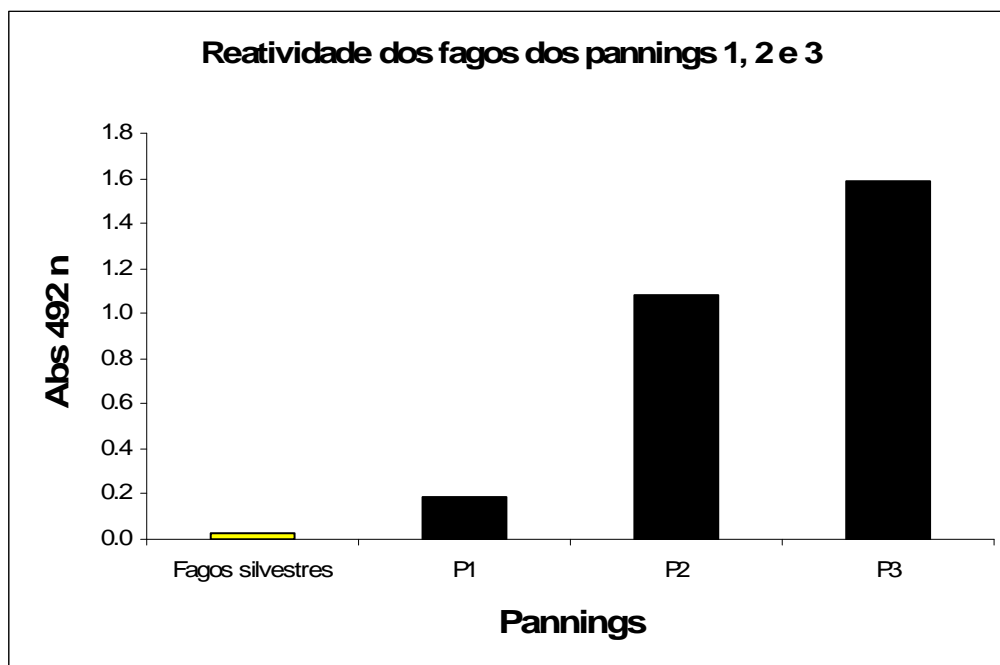
Pode-se observar, na Figura 1, que as imunoglobulinas purificadas anti-*L. chagasi* foram capazes de apresentar elevada reatividade não apenas com o antígeno da referida espécie, mas também em relação aos antígenos de *L. amazonensis* e *L. major*.

### **5.2. Reatividade dos clones de fagos após os três ciclos de seleção.**

Após os três ciclos de bio-seleção (Pannings 1, 2 e 3), foi feita uma ELISA tipo sanduíche para se verificar o aumento da afinidade entre os clones selecionados e amplificados e as imunoglobulinas anti-*L. chagasi* (Figura 02). As imunoglobulinas usadas nessa ELISA foram as mesmas utilizadas para a seleção inicial dos fagos nos ciclos de bio-pannings. Podemos observar, na análise da figura 02, que a reatividade dos clones de fagos foi maior no Panning 3 (P3) sugerindo que, em cada ciclo, a especificidade e a reatividade dos fagos amplificados foi aumentada.



**Figura 01- ELISA de reação cruzada de antígenos de *Leishmania* spp.** Sensibilização da placa de ELISA com 5 µg/ml dos extratos protéicos solúveis de *L. chagasi*, *L. amazonensis* e *L. major* e incubação com diluições seriadas dos anticorpos IgGs anti-*L. chagasi* purificados.



**Figura 02-Reatividade dos fagos dos pannings 1, 2 e 3.** Sensibilização da placa de ELISA com 10 µg/ml de IgG policlonal anti-*L. chagasi* e incubação com  $1 \times 10^{10}$  fagos eluídos dos pannings 1,2 e 3 (P1, P2 e P3). Como controle negativo, fagos silvestres que não expressam peptídeos de interesse foram utilizados nos ensaios.

### **5.3. Seleção individual dos clones de fagos**

A análise individual da reatividade dos clones selecionados no P3 foi realizada através de uma ELISA tipo sanduíche. Foram sensibilizadas duas placas de ELISA com a mistura de IgGs anti-*L. chagasi*, purificadas a partir das amostras de soro dos cães com LV (10 µg/mL). Como controle negativo, foi usado sobrenadante de cultura de fagos silvestres.

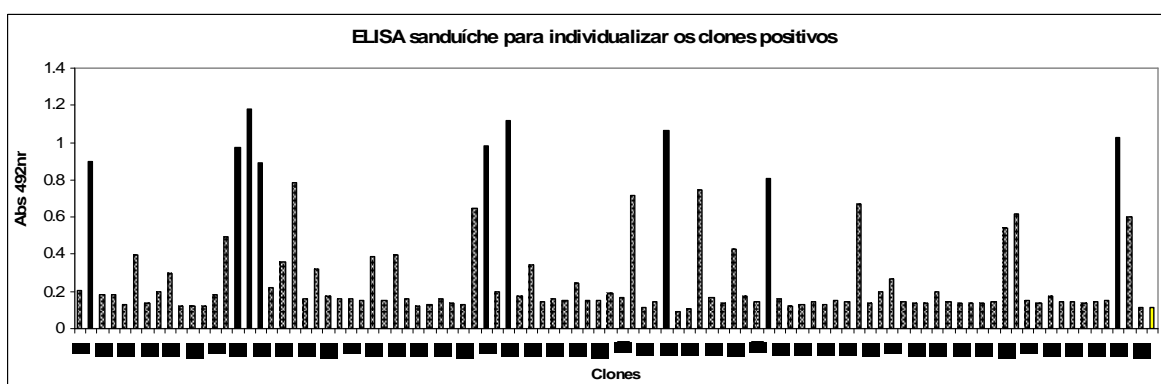
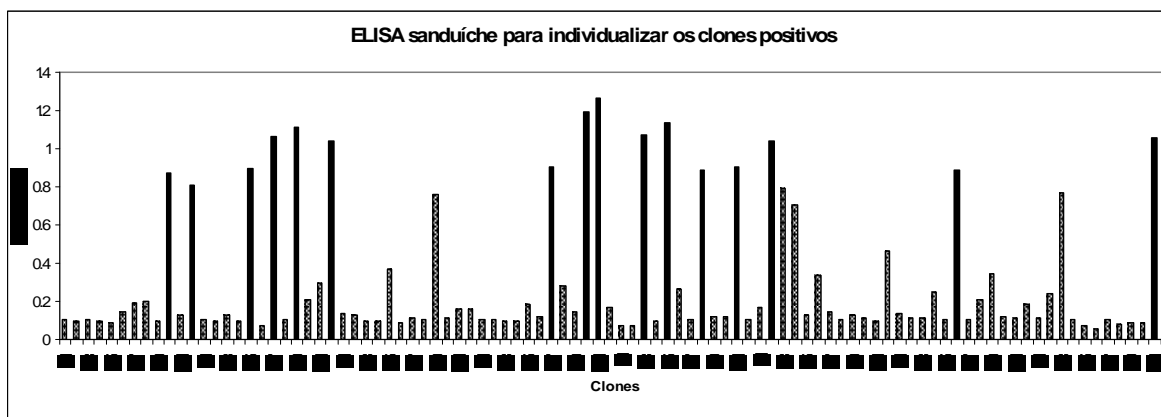
O objetivo desta etapa é individualizar e selecionar apenas os clones com as maiores reatividades. Na figura 03, pode-se observar uma elevada variabilidade na reação de ELISA dos clones de fagos individuais frente ao extrato protéico solúvel de *L. chagasi*. Os clones que apresentaram leitura de absorbância com valores iguais ou maiores a 0,8 (Abs de 492nm), foram considerados positivos.

Dos cerca de 190 clones selecionados, 25 deles mostraram-se positivos. Tais clones foram utilizados para serem testados frente às imunoglobulinas de cães saudáveis e daqueles com doença de Chagas.

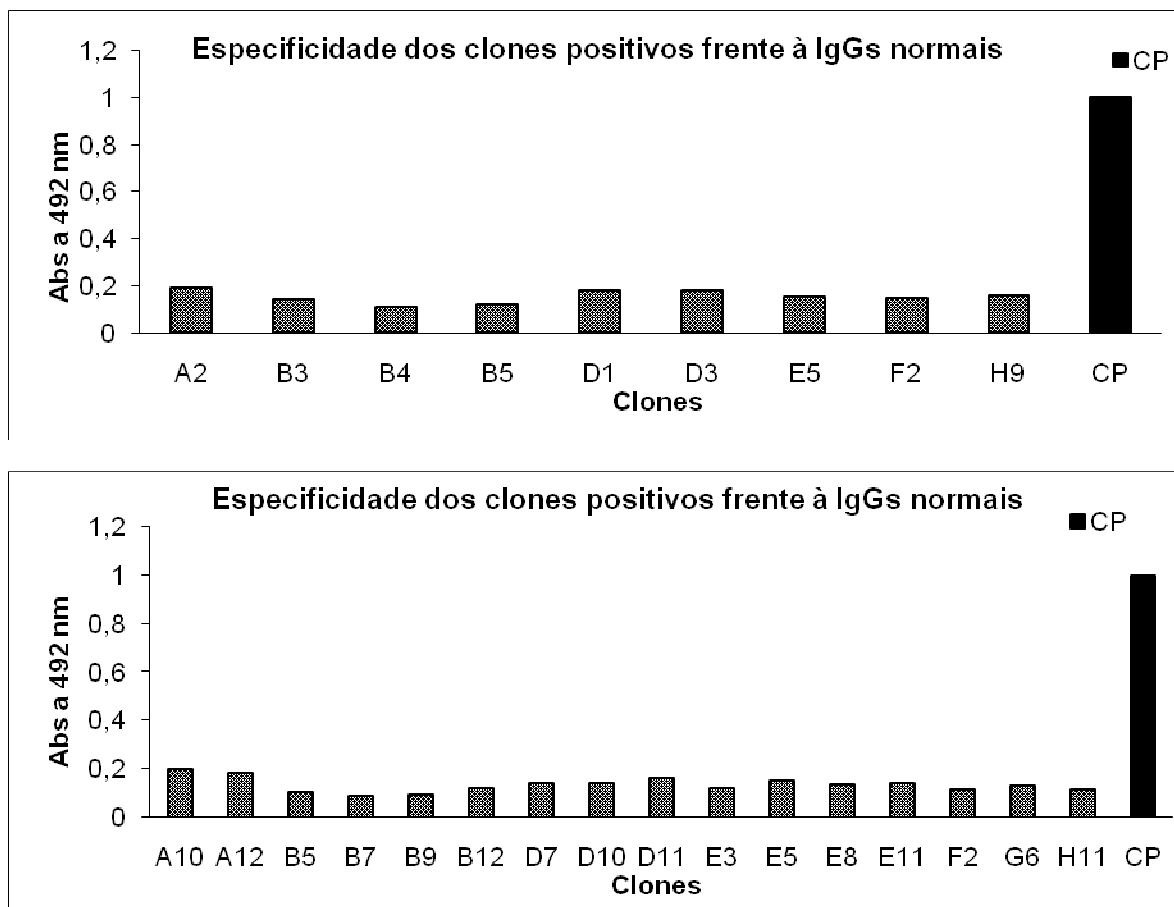
### **5.4. Especificidade dos clones positivos frente às imunoglobulinas purificadas de cães saudáveis.**

Os 25 clones reativos com IgGs de cães com LV foram analisados em relação à sua reatividade com IgGs de cães saudáveis. O resultado, representado na figura 04, demonstra que nenhum dos 25 clones positivos apresentou reatividade elevada frente aos anticorpos purificados a partir de amostras de soro de cães saudáveis.





**Figura 03- ELISA tipo sanduíche para a individualização dos clones de fagos.** Sensibilização da placa de ELISA com 5 µg/ml de IgGs anti-*L. chagasi* e incubação com 50 µl do sobrenadante de cultura de K91 infectada com os fagos de interesse e, no controle negativo, 50 µl de sobrenadante de cultura de K91 infectadas com fagos silvestres.

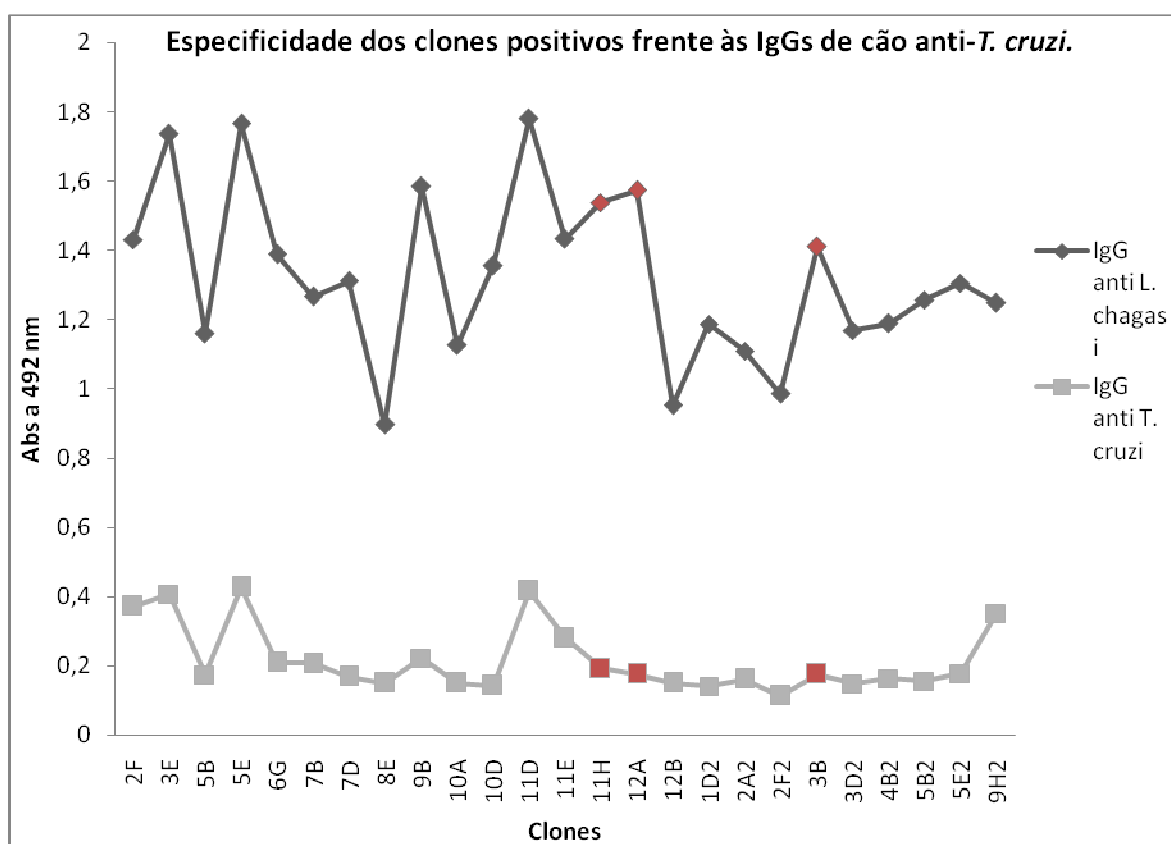


**Figura 04- Especificidade dos clones positivos frente às IgGs de cães saudáveis.** Sensibilização da placa de ELISA com 10 µg/ml de IgGs de cães saudáveis e incubação com 50 µl de sobrenadante de bactérias K91 infectada com os fagos de interesse. Como controle positivo, a placa foi sensibilizada com o pool de IgGs anti-*L. chagasi* e incubada com 50 µl do sobrenadante de um dos fagos positivos.

### 5.5. Especificidade dos clones positivos frente às IgGs de cães com doença de Chagas.

A especificidade dos 25 clones positivos foi verificada novamente através do ensaio de ELISA, na qual as placas de ELISA foram sensibilizadas com 50  $\mu$ l de sobrenadante de cultura de K91 infectada com os fagos selecionados e incubadas com anticorpos IgGs purificados de cães infectados com *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania chagasi*.

A figura 05 demonstra que a reatividade dos 25 clones selecionados em relação às IgGs anti-*T. cruzi* foi baixa, alcançando, na maioria dos clones, absorvância de 0.1 até a alguns valores em torno de 0.5.



**Figura 05- Especificidade dos clones positivos frente às IgGs de cão anti-*T. cruzi*.** Sensibilização com 50  $\mu$ l de sobrenadante de cultura de K91 infectada com os fagos selecionados e incubação com 10  $\mu$ g/ml de IgGs de cães chagásicos.

Os clones que apresentaram elevada reatividade (>1.4) em relação aos anticorpos IgGs anti-*L.chagasi* e baixa reatividade (<0.2) em relação aos anticorpos anti-*T. cruzi* foram selecionados. Dessa forma, três clones (denominados de 3B, 11H e 12A) foram selecionados para o seqüenciamento e posterior realização de ensaios imunológicos.

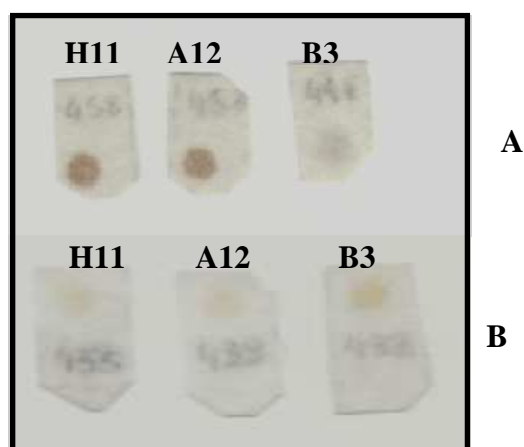
### **5.6.Seqüenciamento dos clones positivos**

Os três clones foram seqüenciados e apresentaram as seguintes seqüências: 3B (TZDZZKLLLXLTRX), 11H (KIXAQDZAGNXS) e 12A (KXZSIZGAVLXV).

### **5.7.Imunoensaios com os peptídeos ligados à membrana**

Após a síntese dos peptídeos 3B, 11H e 12A sobre uma membrana de celulose (com 7 repetições de cada peptídeo), os mesmos foram submetidos à técnica de spot com a utilização de 02 soros de cães com LV, usados na purificação das IgGs anti-*L.chagasi* (Figura 06).

Pode-se observar que os clones 11H e 12A apresentaram elevada reatividade em relação às amostras de soro de cães com LV. O peptídeo 3B não apresentou reação frente às amostras de soro e, dessa forma, não mais foi utilizado nos experimentos.



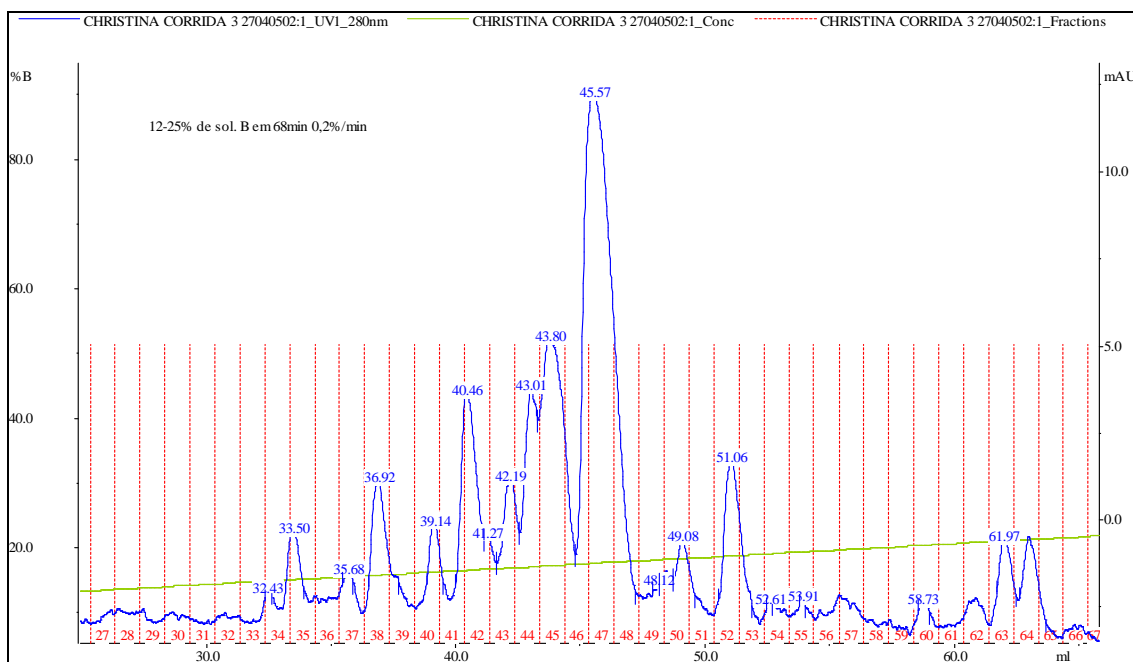
**Fig.06- Análise da reatividade dos peptídeos sobre a membrana de celulose com amostras de soro de cães com LV.** A) Soro imune, B) Soro normal. Os soros foram usados na diluição 1:250. Foi empregado o anticorpo anti-IgG de cão, conjugado à peroxidase, na diluição de 1:500.

## 5.8. Síntese e purificação dos peptídeos em fase sólida

Uma vez verificada a reatividade dos peptídeos 11H e 12A pelo método de spot, os mesmos foram sintetizados na fase sólida pelo método F-moc.

Os peptídeos foram purificados por cromatografia em fase reversa utilizando a coluna Sephasil Peptide C18 – Shimadzu (volume 4.24 mL, diâmetro 0.46 cm e altura 15 cm) acoplada a sistema de HPLC.

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 07*. Os picos principais foram liofilizados e sua análise foi realizada por espectrometria de massa, para confirmação da massa molecular dos peptídeos (figura 08).



**Figura07-** Perfil de eluição dos peptídeos sintéticos em coluna de fase reversa C18 em sistema de HPLC.

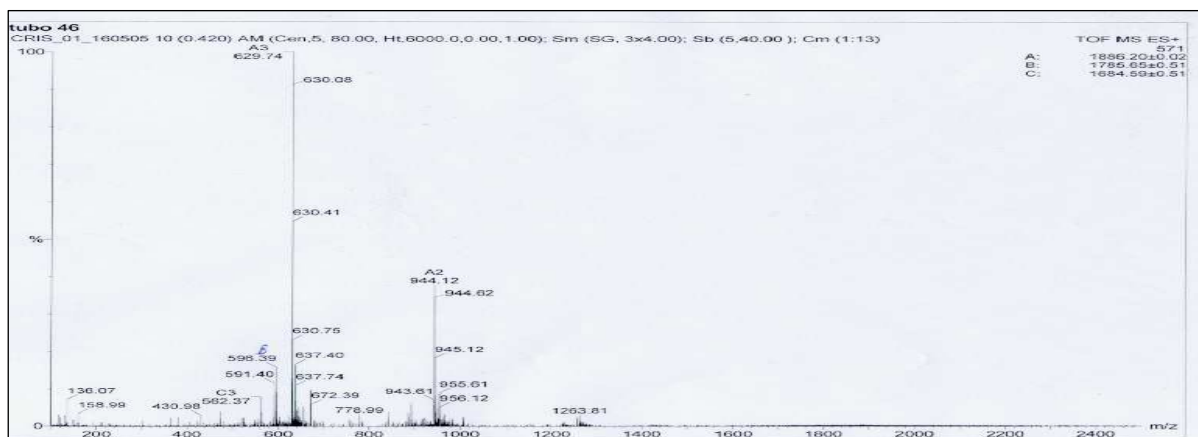


Figura 08-Análise por espectrometria de massa dos picos purificados.

### 5.9. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida dos peptídeos polimerizados

Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida, mostraram que o polímero dos peptídeos 11H e 12 A apresenta massa aproximada entre 30 KDa (Figura 9).

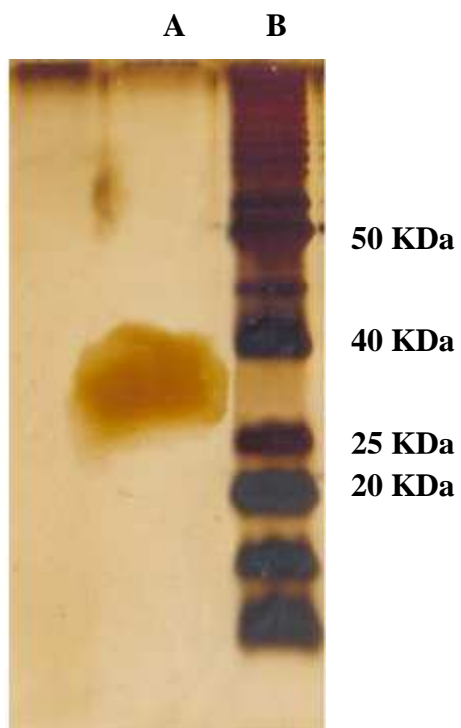
### 5.10 Desenvolvimento de lesão e carga parasitária nos animais imunizados e desafiados com *L. amazonensis*

Camundongos BALB/c foram imunizados com os peptídeos 11H e 12A ligados covalentemente por glutaraldeído, associados ao adjuvante de Freund, como estimulador de resposta inflamatória e foram desafiados com *L. amazonensis*.

Na avaliação do desenvolvimento das lesões (figura 10), pode-se observar que os animais imunizados com o polímero composto pelos peptídeos 11H e 12A apresentaram redução significativa no tamanho dos edemas, quando comparados aos grupos controles.

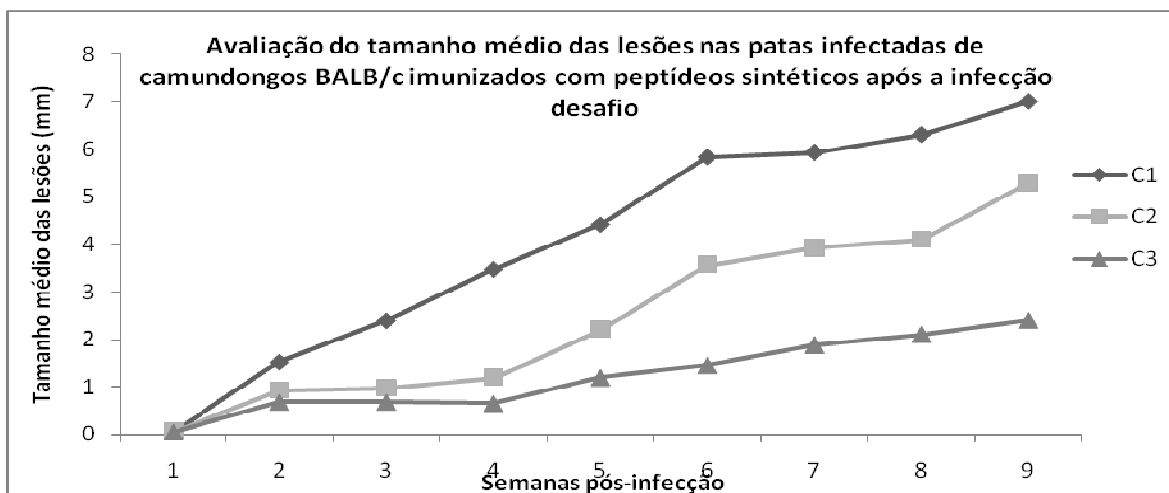
Na avaliação da carga parasitária, pode-se observar (Figura 11) que os animais imunizados com o polímero apresentaram redução significativa na carga recuperada

de parasitas, em relação aos grupos controle C1, C2 e C4, que não apresentaram diferenças entre si.

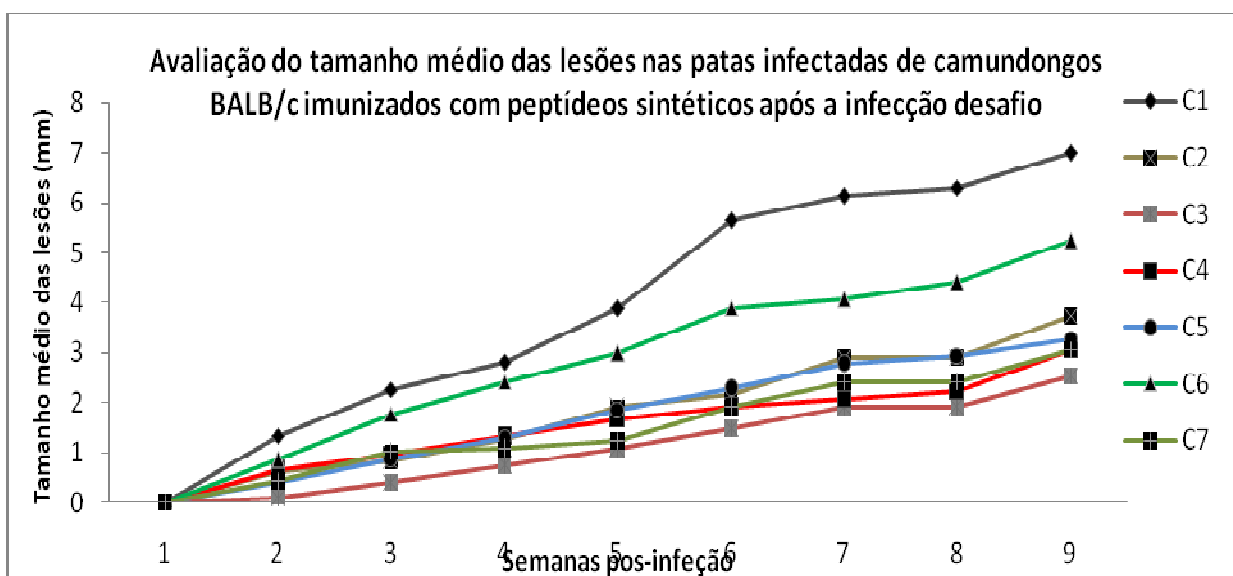


**Figura 9: Eletroforese dos peptídeos polimerizados, SDS-PAGE 10% corado pela prata.** Uma alíquota de 20  $\mu$ l foi separada em gel de poliacrilamida 15% em condições não redutoras e posteriormente coradas pela prata. Canaleta (A) 10  $\mu$ g de polímero 11 H e 12 A; canaleta (B) 5 $\mu$ g Padrão de peso molecular.

A)

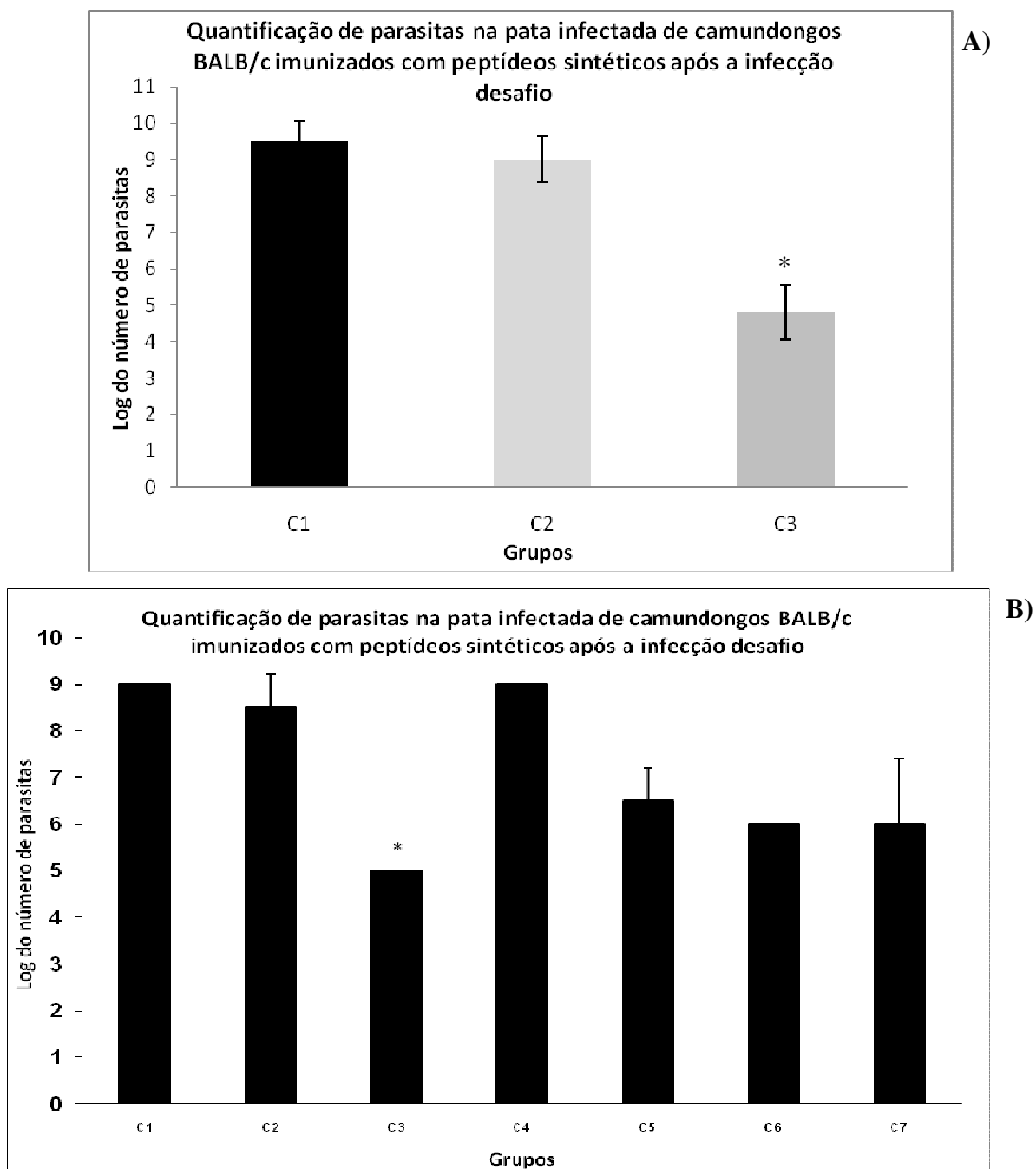


B)



**Figura 10- Avaliação do tamanho médio das lesões nas patas infectadas de camundongos BALB/c imunizados com o polímero, após a infecção desafio com *L. amazonensis*. A) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante e C3= grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12A mais adjuvante. B) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3=Grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mas adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11H mais adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12A mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA mais adjuvante.**





**Figura 11- Quantificação de parasitas nas patas infectadas de camundongos BALB/c imunizados com peptídeos sintéticos, após 8 a 9 semanas da infecção desafio com *L. amazonensis*. A) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3= grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12A mais adjuvante. B) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3=Grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mas adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11H mais adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12 A mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA mais adjuvante.\* indica diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste t-student).**

Dessa forma, pôde-se observar a concordância entre os resultados obtidos na avaliação do tamanho médio das lesões e na carga parasitaria dos animais imunizados com o polímero composto pelos peptídeos 11H e 12A e dos animais dos grupos controle. Estes resultados indicaram a eficácia dos peptídeos 11H e 12A polimerizados, mesmo tendo sido selecionados a partir de amostras de soro de cães infectados com *L. chagasi*, em conferir proteção heteróloga contra *L. amazonensis*.

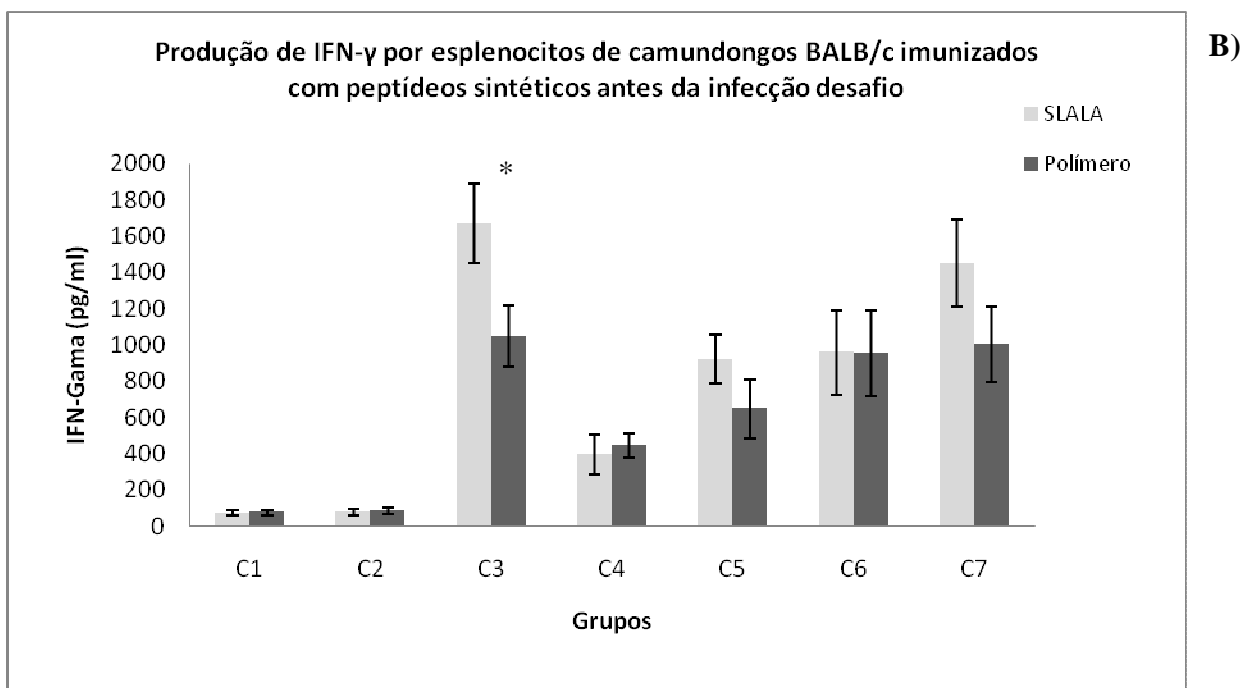
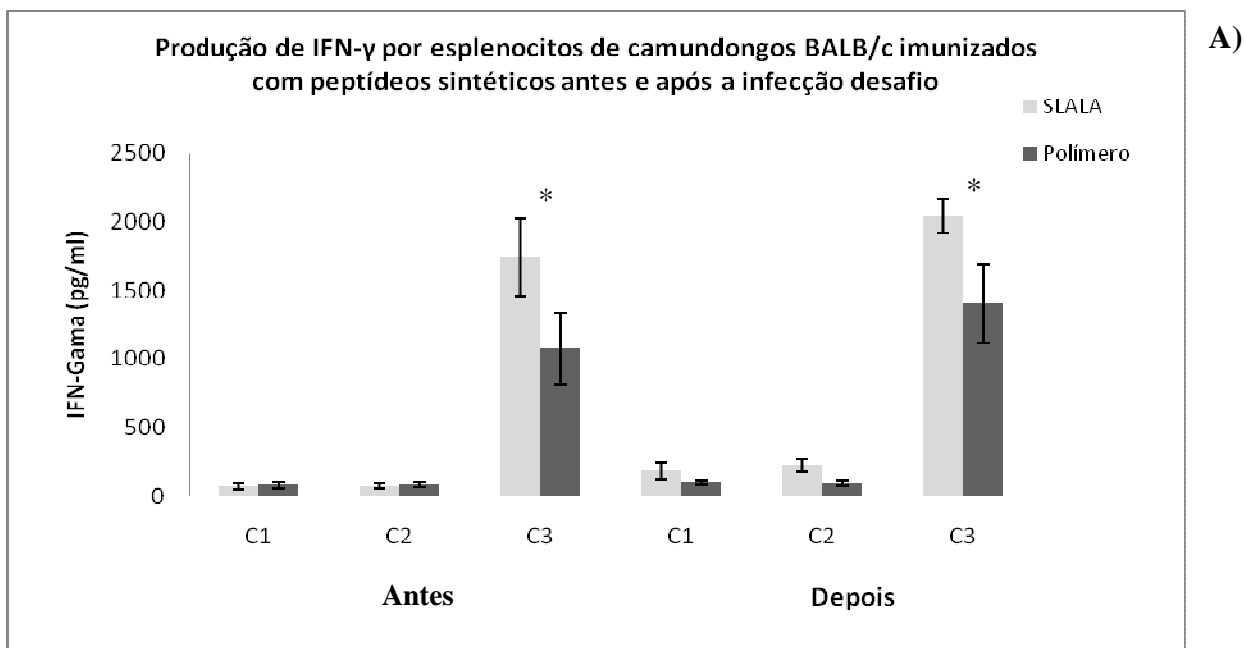
### **5.11 Perfil da resposta imune celular e humoral em camundongos BALB/c imunizados, antes e depois a infecção desafio com *L. amazonensis***

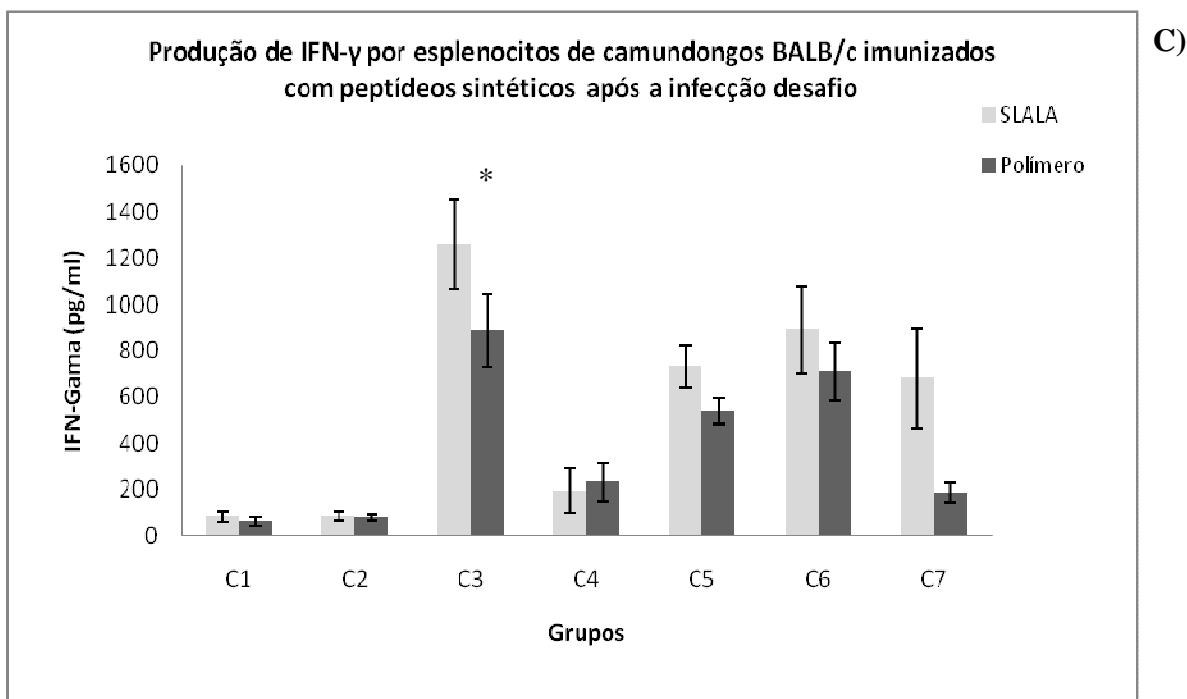
Na avaliação da resposta imune celular, foi realizada a determinação dos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 nos sobrenadantes de cultura celular dos esplenócitos dos animais imunizados e/ou desafiados.

Pode-se observar, pela análise da figura 12A, que os animais dos grupos controle C1 e C2 apresentaram, antes e após a infecção desafio, uma baixa produção de IFN- $\gamma$  utilizando os peptídeos sintéticos ou o SLALA como antígenos estimuladores das células. Na figura 12B, observa-se também que os grupos controle C1 e C2 apresentaram níveis baixos de IFN- $\gamma$ , enquanto que o grupo C7 mostra níveis altos de IFN- $\gamma$ .

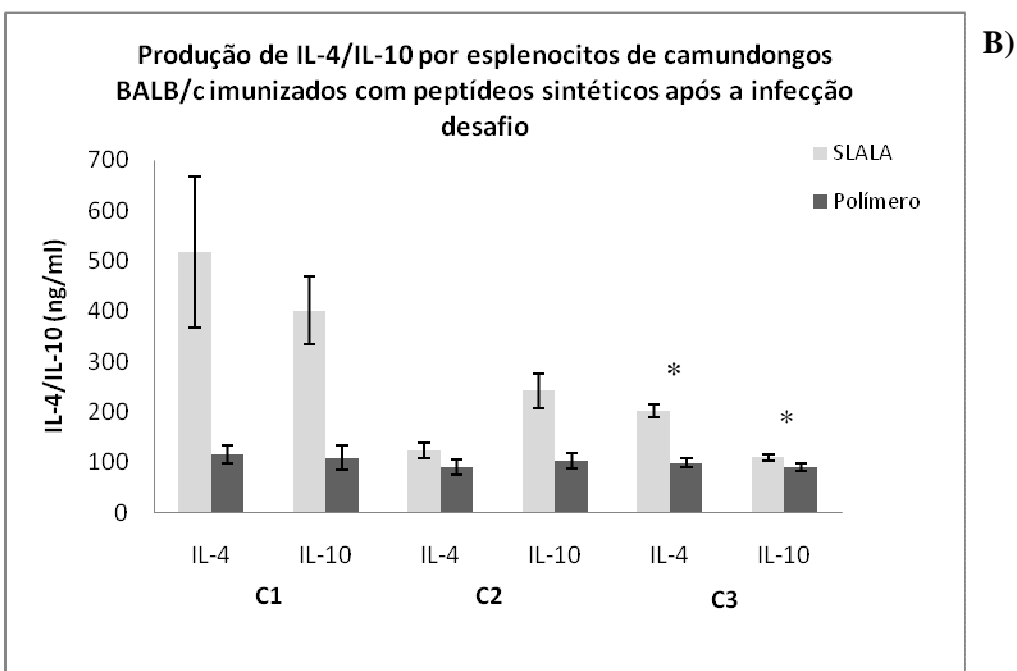
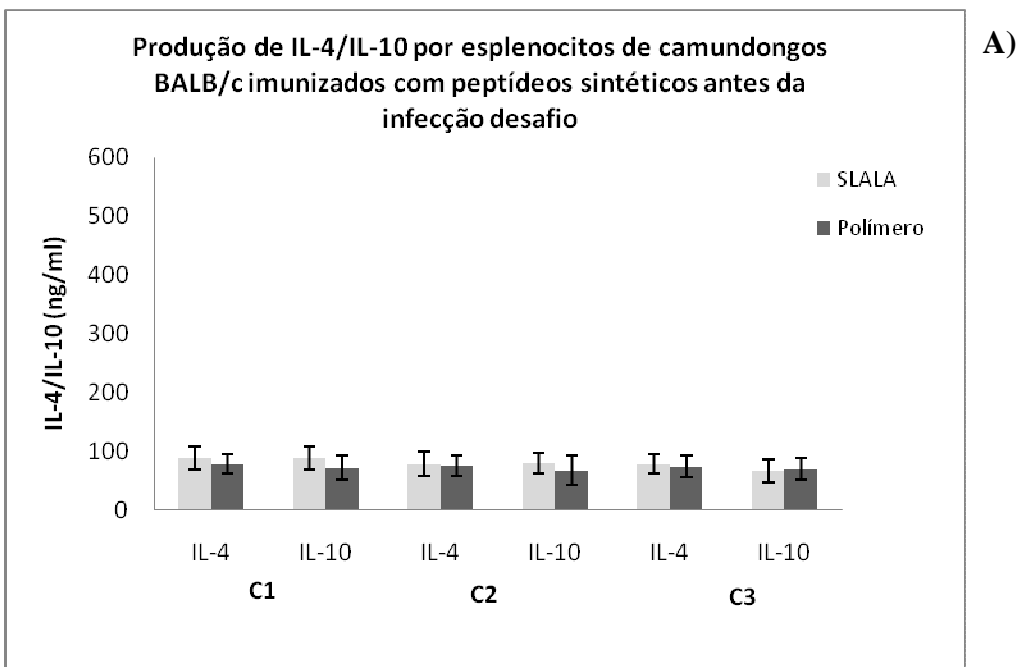
Nos animais imunizados com os peptídeos, observou-se que seus esplenócitos produziram níveis elevados de IFN- $\gamma$ , antes e após o desafio (figuras 12A e 12C), quando estimulados tanto com os peptídeos quanto com o SLALA. A produção observada foi significativamente maior após o desafio, em relação aos níveis obtidos antes da infecção, utilizando o polímero ou o SLALA como antígenos sensibilizadores.

Na avaliação dos níveis de IL-4 e IL-10 pelos sobrenadantes das culturas de esplenócitos, pode-se observar que, antes da infecção desafio, os níveis dessas citocinas foram similares nos grupos avaliados, utilizando-se o polímero dos peptídeos 11H e 12A ou o SLALA como antígenos estimuladores das células esplênicas (Figura 13A, C e E).

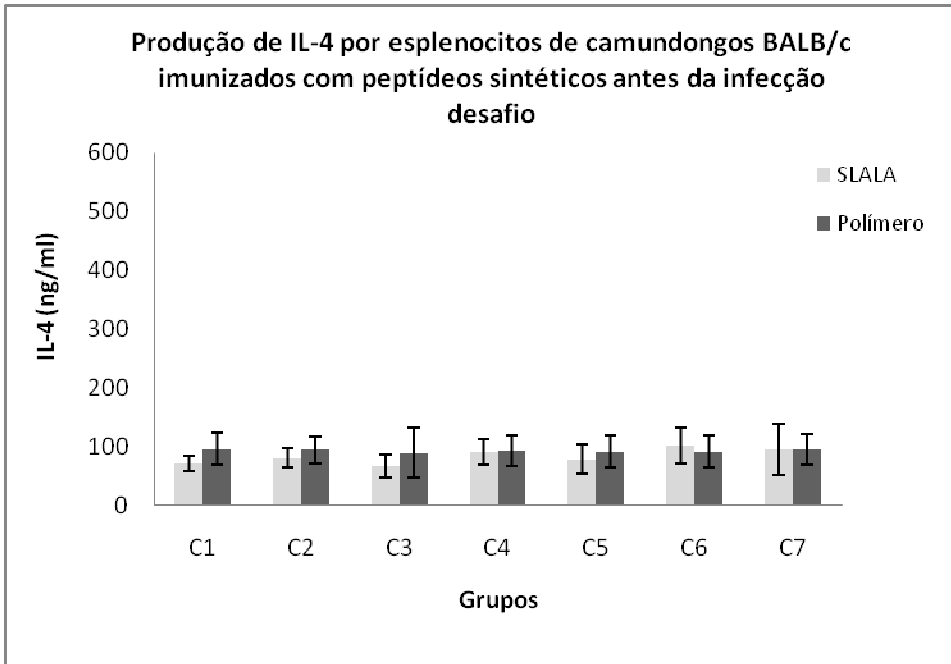




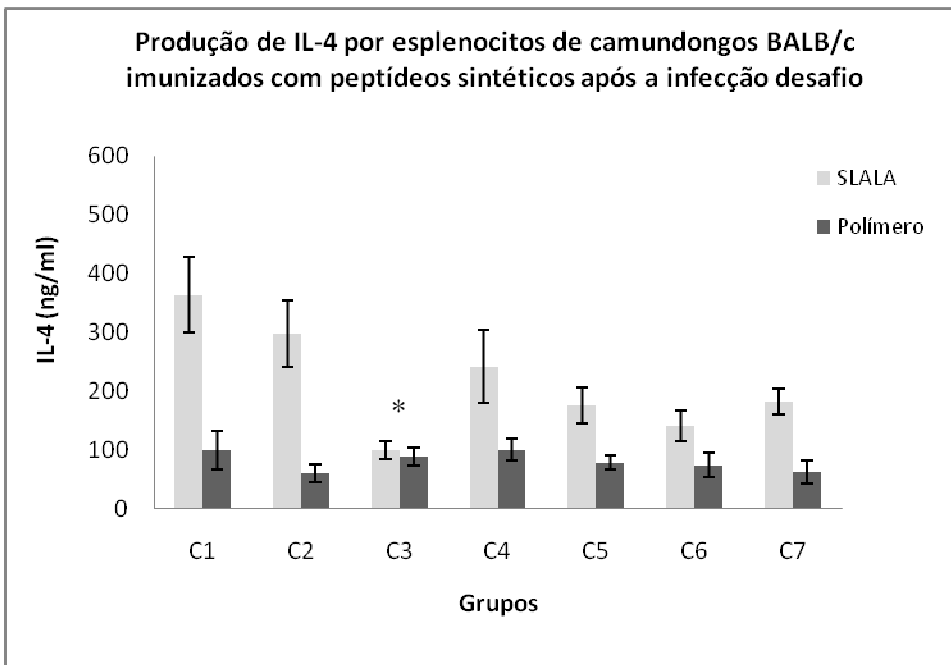
**Figura 12- Produção de IFN- $\gamma$  pelos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados, após a infecção desafio com *L. amazonensis*.** A) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante e C3= grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12A mais adjuvante. B e C) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3=Grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mas adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11H, mais adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12A, mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA, mais adjuvante. Sensibilização com 50  $\mu\text{g/ml}$  de SLALA ou 10  $\mu\text{g/ml}$  do polímero e incubação com sobrenadante de cultura de esplenócitos (100  $\mu\text{l}$ ). \*indica diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste *t* de Student).

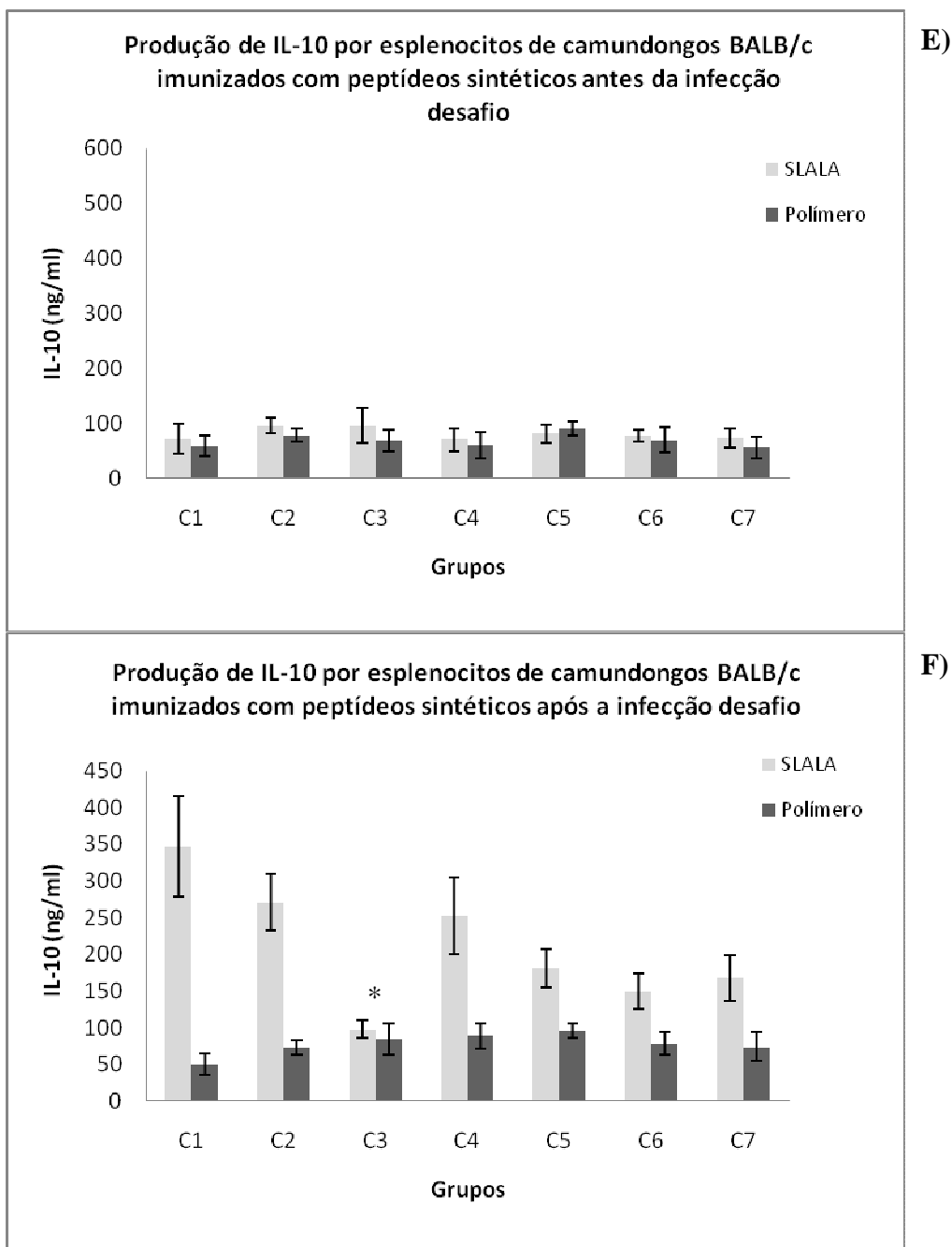


C)



D)





**Figura 13- Produção de IL-4 e IL-10 pelos esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com o polímero, antes e após a infecção desafio com *L. amazonensis*. A e B) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3= grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12A mais adjuvante. C, D, E e F) C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3=Grupo de animais imunizados com o polímero 11H e 12A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mais adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11H, mais adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12A, mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA, mais adjuvante. Sensibilização com 50 µg/ml de SLALA ou 10 µg/ml do polímero e incubação com sobrenadante de cultura de esplenócitos (100 µl). \*indica diferença estatística significativa (p<0.05 teste *t* de Student).**

Após o desafio, os animais do grupo C1 produziram níveis significativamente maiores de IL-4 e IL-10 em relação aos animais imunizados com o polímero associado ao adjuvante (Figura 13), utilizando-se o SLALA como antígeno estimulador.

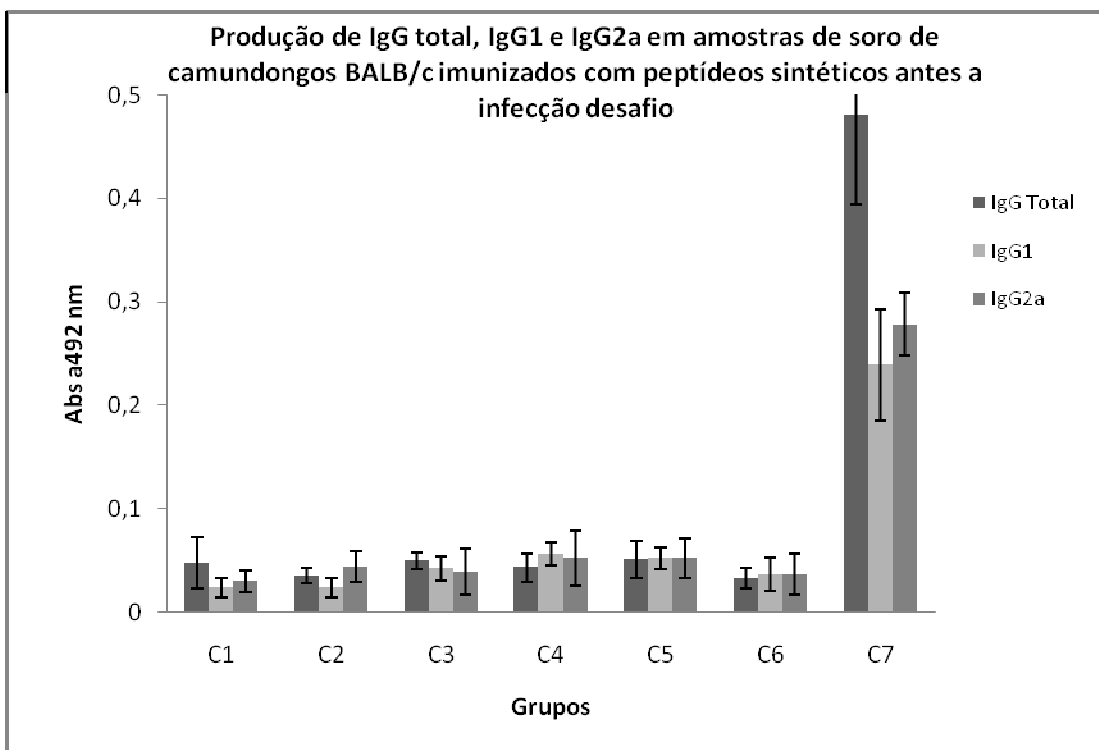
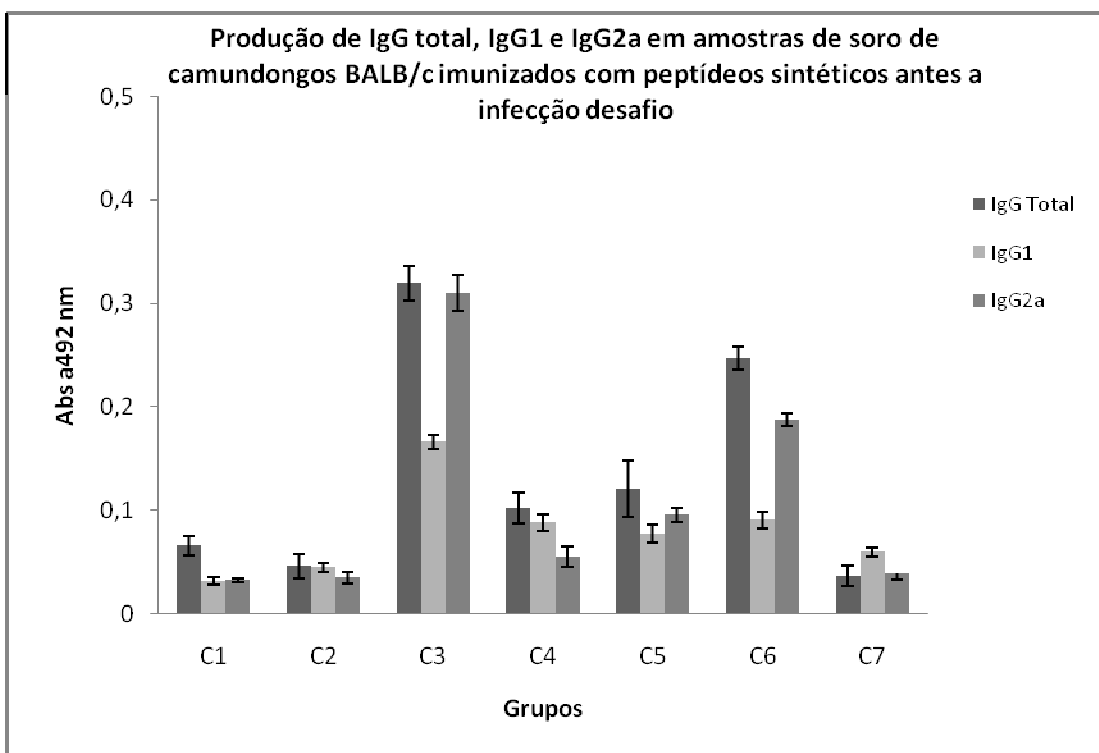
Os níveis de IL-4 entre os animais dos grupos C2 e C3 foram similares, embora com valor médio acima encontrado para o último grupo. Entretanto, na avaliação dos níveis de IL-10, pode-se observar que tal citocina encontra-se com valores médios significativamente maiores no grupo adjuvante, em relação aos animais imunizados com o polímero, utilizando-se o SLALA como antígeno estimulador das células esplênicas (Figura 13).

A produção de anticorpos foi também avaliada nos animais imunizados com o polímero, antes e após a infecção desafio com *L. amazonensis*.

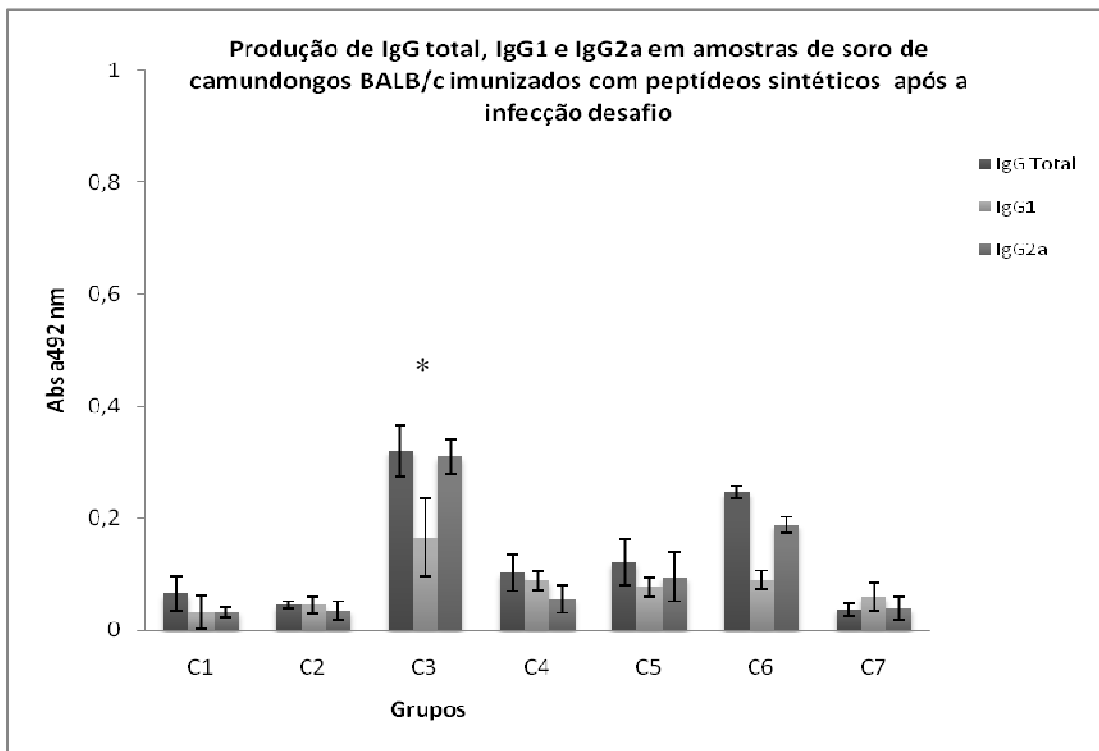
Pode-se observar, pela análise da figura 14 A, que os animais imunizados com o polímero apresentaram níveis de anticorpos IgG2a maiores em relação aos níveis de IgG1, antes da infecção desafio, quando o próprio polímero dos peptídeos 11H e 12A foi utilizado como antígenos sensibilizadores das placas de ELISA. Após o desafio, tal perfil de resposta não foi alterado.

Quando o SLALA foi utilizado como antígeno sensibilizador, pôde-se observar que, antes da infecção desafio, os animais de todos os grupos apresentaram baixos níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a. Entretanto, após o desafio, observou-se que os animais dos grupos PBS e adjuvante produziram níveis de IgG1 específicos ao parasita significativamente maiores em relação aos níveis de IgG2a (Figura 14).

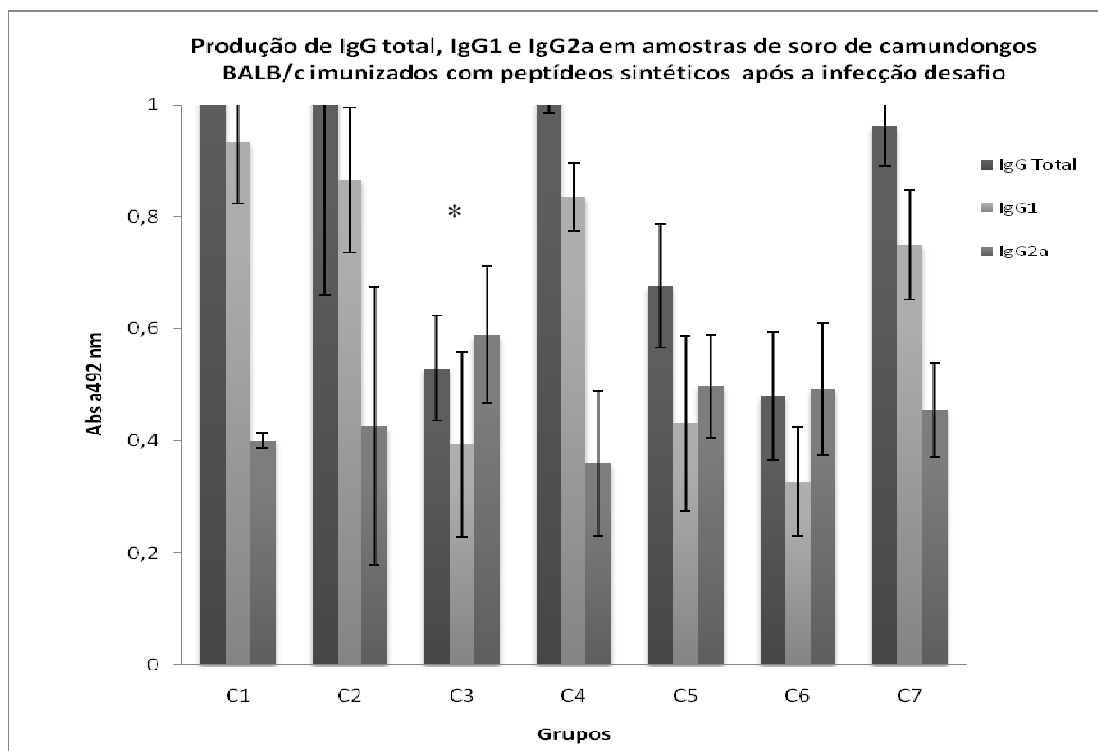




C)



D)



**Figuras 14- Produção de IgG total, IgG1 e IgG2a em amostras de soro de camundongos BALB/c imunizados com o polímero e SLALA, antes e após a infecção desafio.** C1=Grupo PBS, C2=Grupo adjuvante, C3= grupo de animais imunizados com o polímero dos peptídeos 11H e 12A mais adjuvante, C4=Grupo de animais imunizados com o polímero de um peptídeo não relacionado com *L. amazonensis*, mas adjuvante, C5=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 11H, mais adjuvante, C6=Grupo de animais imunizados com o polímero do peptídeo 12A, mais adjuvante e C7=Grupo de animais imunizados com SLALA, mas adjuvante. Sensibilização das placas de ELISA com 0,5 µg/ml do polímero dos peptídeos 11H e 12A (A e C) ou com 1 µg/ml de SLALA (B e D) e incubação com amostras de soro de camundongos, na diluição de 1:100. \* indica diferença estatística significativa ( $p < 0.05$  teste *t* de Student).

# Discussão

---

## 6 Discussão

*Leishmania amazonensis* é um dos principais agentes etiológicos de leishmanioses nas Américas e é associado a um amplo espectro de sintomas clínicos nos seres humanos, que variam desde a infecção assintomática à doença visceral, potencialmente fatal (Grimaldi, et al.,1989). Além disso, a espécie *L. amazonensis* possui áreas de distribuição comuns a outras espécies de *Leishmania*, tais como a *L. chagasi* (Grimaldi et al.,1993).

A leishmaniose visceral canina (LVC) tem sido considerada a mais importante causa para o alastramento da doença em humanos. É comum a migração de cães infectados, acompanhando seus donos, para áreas não endêmicas (Arias *et al.*, 1996). O controle da LVC ainda é feito através da eliminação dos cães infectados (Alencar, 1961), devido à ineficácia na terapêutica desta enfermidade.

O desenvolvimento de uma vacina contra leishmanioses é desejado não só como uma medida profilática assim como no tratamento da doença (Palatnik-de-Sousa, 2008). Vacinas de primeira geração, compostas por parasitas mortos e extratos brutos substituíram a leishmanização. Na América, muitas vacinas usam o lisado de *L. amazonensis* (Vélez, 2005; Armijos, 2004) ou a mistura de espécies nativas (Antunes, 1986). No Velho Mundo é usado o antígeno autoclavado de *L. major* (ALM). A autoclavagem de vacinas de parasitas mortos foi introduzida como a melhor maneira de esterilizar e preservar as vacinas em lugares onde não há infra-estrutura necessária para a manutenção das vacinas.

Vacinas de segunda geração usam parasitas vivos geneticamente modificados, bactérias ou vírus que contêm genes de antígenos de *Leishmania* ou frações nativas purificadas do parasita. Vacinas que usam parasitas vivos geneticamente modificados, *Leishmanias knockout*, causam uma resposta imune específica, provocada por uma infecção abortiva que não causa doença. Entre os genes que codificam proteínas como alvo temos *drts* (Cruz, 1991), *Cp* (Souza, 1994; Alexander, 1998) e *Bt* (Papadopoulo, 2002).

As vacinas de terceira geração são as que usam como antígenos vacinais DNA, proteínas derivadas de saliva do vetor e peptídeos sintéticos. Dentre os antígenos vacinais baseados em DNA mais promissores temos LEIF, TSA, LmsT11, H1, CpA+CpB, KMP11e NH36 que nos próximos 4 anos deveram ser testados em vários modelos animais (Palatinik-de-Sousa, 2008). Baseados na observação de que a saliva do vetor incrementa a infectividade do patógeno, vem se testando antígenos que não só protegem contra a infecção, mas que também diminuem a viabilidade e reprodutibilidade do parasita no vetor. Este e o caso da proteína maxadilana (Brodie, 2007) e do antígeno SP15 obtido do *Phlebotomus papatasi* que induz substancial resistência em camundongos contra a infecção desafio com *L. major* (Valenzuela, 2001). Recentes achados sugerem que células T CD8+ e CD4+ podem ter um papel crucial na defesa e cura nas leishmanioses. A identificação de epitopos que reconheçam CD8+ para poder serem usados como vacinas sintéticas são de suma importância no controle das leishmanioses.

Neste sentido, no presente trabalho, utilizamos as técnicas de *phage display* e *spot synthesis* com o intuito de identificar epitopos/mimotopos que apresentassem reatividade com anticorpos purificados de soro de cães infectados com *Leishmania chagasi* e que, após serem sintetizados quimicamente, pudessem ser utilizados em protocolos de vacinação de camundongos BALB/c a fim de se verificar sua possível eficácia de proteção contra a infecção experimental pela espécie *L. amazonensis*, uma importante espécie causadora de leishmaniose tegumentar no Brasil e em países das Américas.

*Phage display* é uma metodologia, desenvolvida por Smith (1985), que se caracteriza pela combinação de técnicas moleculares na apresentação de peptídeos na superfície de fagos. A partir de uma biblioteca construída em fagos filamentosos, seleciona-se o peptídeo baseando-se em sua afinidade por um ligante-alvo fixado. No caso de anticorpos é possível selecionar e identificar seu(s) respectivo(s) epitopo(s).

Nos últimos anos, a utilização de clones de bacteriófagos expressando peptídeos de interesse ou de peptídeos sintéticos mostrou-se como uma ferramenta eficaz na indução de proteção em modelos experimentais contra algumas doenças de

importância em todo o mundo (Bastien et al., 1997; Manoutcharian et al., 1999; Irving et al., 2001; Noya et al., 2003; Manoutcharian et al., 2004).

Após a purificação das imunoglobulinas da classe IgG de cães portadores da infecção por *L. chagasi*, foi verificado que estas reagem cruzadamente com antígenos presentes em extratos solúveis das espécies *L. amazonensis* e *L. major*, resultados que confirmam a identidade antigênica entre espécies do gênero *Leishmania* (Reed, 1987).

Anticorpos anti-*L. chagasi* foram usadas para sensibilizar as placas utilizadas nos ciclos de bio-seleção. Três ciclos foram realizados para que a especificidade de ligação dos fagos às imunoglobulinas aumentasse gradativamente, uma vez os fagos selecionados no primeiro ciclo são amplificados e utilizados no ciclo seguinte. Na realização do terceiro ciclo, a placa foi sensibilizada com uma quantidade cinco vezes menor de imunoglobulinas e, conseqüentemente, apenas os fagos que possuíssem uma elevada afinidade em relação às moléculas alvo seriam selecionados e amplificados novamente.

Vinte e cinco clones considerados os mais reativos frente ao anticorpo anti-*L. chagasi* foram testados quanto à possibilidade da existência de reação cruzada com anticorpos purificados de cães com doença de Chagas. Entre os 25 clones avaliados, três deles apresentaram alta reatividade com os anticorpos anti-*L. chagasi* e baixa reatividade em relação aos anticorpos de cães saudáveis ou anti-*T. cruzi*. Os três clones positivos selecionados (denominados de 3B, 11H e 12A) tiveram seus DNAs extraídos, foram seqüenciados e suas estruturas primárias deduzidas. Para verificar a existência de homologia com epítomos presentes em proteínas de *L. chagasi* ou de outros organismos, uma análise em banco de dados BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul, 1990) foi realizada e não se encontrou homologia com nenhuma proteína já descrita, possivelmente, ou por tratar-se de epítomos conformacionais ou de serem mimotopos.

Após a síntese dos peptídeos (KXZSIZGAVLXV (12A), KIXAQDZAGNXS (11H) e TZDZZKLLLXLTXRX (3B)) sobre a membrana de celulose, verificou-se que um dos peptídeos, denominado de 3B, não mais apresentou reação com amostras de soro que foram utilizadas para a purificação das IgGs anti-*L. chagasi*, acreditamos que o peptídeo ao ser sintetizado na membrana de celulose tenha mudado a sua

conformação e assim, sua capacidade de ser reconhecido pelos anticorpos presentes no soros. Os peptídeos 11H e 12A foram então sintetizados na sua forma solúvel pelo método F-moc (F-moc *synthesis*) e utilizado para os experimentos de imunização.

Como estratégia para aumentar a resposta imune em camundongos BALB/c, os peptídeos sintéticos foram misturados e usados como imunógenos após serem previamente polimerizados por ligação covalentemente usando glutaraldeído como espaçador (Machado de Avila, et al., 2004). De esta forma obtivemos o antígeno de aproximadamente 30 kDa de massa molecular avaliado por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Na avaliação da carga parasitaria, observou-se que os animais imunizados, após 8 a 9 semanas da infecção desafio, apresentaram uma redução significativa do tamanho médio das lesões e do numero de parasitas vivos, quando comparados aos animais dos grupos controle. Dados semelhantes foram demonstrados por Coelho et al. (2003), na qual usaram o antígeno A2 como imunógeno.

A proteção induzida pela imunização com os peptídeos sintéticos foi associada à presença de níveis elevados de IFN- $\gamma$  e uma baixa produção de IL-4 e, especialmente, de IL-10. Tal fato pode é consistente com a associação direta de níveis elevados de IFN- $\gamma$ , um marcador da resposta imune Th1, com a indução de proteção contra várias espécies de *Leishmania* (Afonso & Scott, 1993; Jones, et al., 2000; Kaye, et al., 1991; Kima, et al., 2000).

A susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis*, assim como é observado com *L. chagasi*, parece ser devido a uma falha do sistema imune do animal na montagem de uma resposta Th1, preferivelmente, do que uma resposta Th2 exacerbada (Afonso & Scott, 1993; Ji et al., 2000; Soong, et al., 1997). Alguns trabalhos, tais como observado em Jones et al. (2000), demonstraram que, na infecção de camundongos BALB/c com *L. amazonensis*, a susceptibilidade à doença está associada à uma deficiência na expressão do receptor da IL-12 nas células parasitadas, sendo independente dos níveis produzidos de IL-4.

Na análise comparativa, os animais imunizados com o polímero dos peptídeos 11H e 12A apresentaram reduções significativas no tamanho médio das lesões e na



carga parasitária produziram níveis significativamente menores de IL-10 quando comparados aos grupos controle, demonstrando, possivelmente, o efeito imunomodulador desta citocina sobre o estabelecimento de uma resposta pró-inflamatória, necessária para a proteção *in vivo* contra a infecção por *Leishmania*. (Padigel, 2003).

Outra diferença observada entre os animais imunizados com o polímero em relação aos demais grupos foi à resposta humoral. Os animais imunizados produziram níveis mais baixos de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a específicos ao parasita, quando comparados com os níveis observados nos demais grupos. Alguns trabalhos, como o descrito por Kima et al. (2000), demonstram que a presença de altos níveis de anticorpos pode causar efeitos deletérios ao fenótipo de proteção contra a infecção por *Leishmania*. Dessa forma, os níveis elevados de IgG total, IgG1 e IgG2a observados nos animais não protegidos contra *L. amazonensis* pode ter tido papel importante na susceptibilidade à infecção e ter contribuído a progressão da doença.

# Conclusões

---

## 7 Conclusões

- A técnica de *phage display* possibilitou a seleção de clones de bacteriófagos reativos com anticorpos IgGs purificados de cães com leishmaniose visceral.
- A resposta imune induzida pelo polímero composto pelos peptídeos sintéticos 11H e 12A, associado ao adjuvante de Freund, caracterizou-se pela elevada produção de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de IL-4, IL-10 e de anticorpos anti-parasita. A imunização foi capaz de induzir proteção significativa em camundongos BALB/c contra o desafio com *L. amazonensis*.

Este é o primeiro reporte acerca da imunoproteção alcançada pela imunização com peptídeos sintéticos selecionados por *phage display* e *spot synthesis* a partir da espécie *L. chagasi*.

# Perspectivas

---

## **8 Perspectivas**

- Uso de anticorpos anti-peptídeos em ensaios de imunolocalização das proteínas do parasita mimetizadas pelos peptídeos sintéticos.
- Avaliar outros esquemas de imunização a fim de se obter um modelo ideal de imunização que possa induzir à máxima proteção contra a infecção desafio.
- Testar a eficácia protetora dos peptídeos sintéticos frente às outras espécies de *Leishmania*.
- Testar os peptídeos sintéticos em outros modelos animais e também como possíveis agentes imunoterápicos.
- Testar os peptídeos sintéticos como antígenos sensibilizadores de placas de ELISA e seu potencial para serem utilizados no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina.

# Referencias bibliográficas

---

## **9 Referências bibliográficas**

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; CUPOLILO, S.M.N.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; GONCALVEZ DA COSTA, S.C. (2004) Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Vet. Parasitol.**, 121:179-187.

AFONSO, L.C. and SCOTT, P. (1993) Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, 61:2952-2959.

ALENCAR, J.E. (1961) Profilaxia do Calazar no Ceará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. S.P.**, 3:175-180.

ALEXANDER, J.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. (1998) *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a TH1 response. **J. Immunol.**, 161:6794—801.

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

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

ANTUNES, C.M.; MAYRINK, W.; MAGALHˆAES, P.A.; COSTA, A.; MELO, M.N.; DIAS, M.; ET AL. (1986) Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Epidemiol.**, 15:572-80.

ARIAS, J.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. (1996) The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. **Euro. Infect. Dis.**, 2:145- 146.

ARMIJOS, R.X.; WEIGEL, M.M.; CALVOPINA, M.; HIDALGO, A.; CEVALLOS, W.; CORREA, J. (2004) Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, 22:1320-6.

ASHFORD, R.W.(2000) The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasit.**, 30:1269-1281.

BASTIEN, N.; TAYLOR, G.; THOMAS, L.H.; WYLD, S.G.; SIMARD, C.; TRUDEL, M.(1997) Immunization with a peptide derived from the G glycoprotein of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) reduces the incidence of BRSV-associated pneumonia in the natural host. **Vaccine**, 15:1385-90.

BRADOFORD, M.M.; (1976).A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.**, 72:248-254.

BRODIE, T.M.; SMITH, M.C.; MORRIS, R.V.; TITUS, R.G. (2007) Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. **Infect. Immun.**, 75:2359-65.

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



CALDAS, A.J.; SILVA, D.R.; PEREIRA, C.C.; NUNES, P.M.; SILVA, B.P.; SILVA, A.A.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.(2001) *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in children from an endemic area of visceral leishmaniasis in the São Luis Island-MA, Brazil. **Rev. Soc. Brás. Méd. Trop.**,34:445-451.

CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; FONSECA, S.C.G.; CAMPOLINA, D.; AMARAL, C.F.S.(1994) ELISA for the detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Toxicon**, 32:1649-1656.

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

COELHO, E.A.F.; TAVARES, C.A.P.; CARVALHO, F.A.A.; CHAVES, K.F.; TEIXEIRA, K.M.; CHAREST, H.; RODRIGUES, R.C.; MATLASHEWSKY, G.; GAZZINELLI, R.T.; FERNANDES, A.P. (2003). Immune Responses Induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 Antigen, but Not by the LACK Antigen, Are Protective against Experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Infection. **Infection and Immunity**, 71:3998-3994.

CRUZ, A.; COBURN, C.M.; BEVERLEY, S.M. (1991) Double targeted gene replacement for creating null mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 88:7170-4.

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

FRANK, R. (1992) Spot-Synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron**, 48: 9217-32.

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

FERREIRA, W.A.; MAYRINK, W.; MARES-GUIA, M.L.; TAVARES, C.A.P. (2003) Detection and characterization of *Leishmania* antigens from a American cutaneous leishmaniasis for diagnosis of visceral leishmaniasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 45:35-43.

GARCEZ, L.M.; GOTO, H.; RAMOS, P.K. ; BRIGIDO, M.C. ; GOMES, P.A.F. ; SOUZA, R.A. ; DE LUCA, P.M. ; MENDONCA, S.C.; MUNIZ, J.A.P.C.; SHAW, J.J. (2002) *Leishmania (Leishmania) amazonensis*- induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. **Int J. Parasitol.**, 32:1755-1764.

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

GRIMALDI Jr, G.; TESH, R.B.; McMAHON-PRATT, D.(1989) A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 41:687-725.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B.(1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research, **Clin. Microbiol. Rev.**, 6: 230–250.

GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D.L.; SEDER, R.A. (1998) Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. **Nat. Med.**, 4:1409-15.

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

HOHNE, W.E.; KUTTNER, G.; KIEBIG, S.; HAUSDORF, G.; GRUNOW, R.; WINKLER, K.; WESSNER, H.; GIEBMANN, E.; STIGLER, R.; SCHNEIDER-HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. (1995) Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 89:55-73.

IRVING, M.B.; PAN, O.; SCOTT, J.K. (2001) Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 5:314-24.

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

JAFFE, C.L. (1999) Recent trends in vaccine development and immunization. **Clin. Dermatol.**, 17:339-344.

Jl, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. (2002) Analysis of the T helper cell responses during infectiob with *Leishmania amazonensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 66:338-345.

JONES, D.E.; BUXBAUM, L.U.; SCOTT, P. (2000) IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, 165:364-372.

KANE, M.M. and MOSSER, D.M. (2000) *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr. Opin. Hematol.**, 7:26-31.

KANE, M.M. and MOSSER, D.M. (2001) The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniasis. **J. Immunol.**, 166:1141-1147.

## *Referencias Bibliográficas*

KIMA, P.E.; CONSTANT, S.L.; HANNUM, L.; COLMENARES, M.; LEE, K.S.; HABERMAN, A.M.; SHLOMCHIK, M.J.; McMAHON-PRATT, D. (2000) Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, 191:1036-1067.

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

LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**227:680-685.

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

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

LIMA, G.M.C.A.; PUEL, A.; DESCREUSEFOND, C.; BOUTHILLER, Y.; MEVEL, J.C.; ABRAHAMSOHN, I.A. ; MOUTON, D. (1998) Susceptibility and resistance to *Leishmania amazonensis* in H-2<sup>a</sup> syngenic high and low antibody responder mice (Biozzi mice). **Scand. J. Immunol.**, 48:144-151.

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

LIU, Z., SONG, D.; KRAMER, A.; MARTIN, A.C.; DANDEKAR, T.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; BAUTZ, E.K.; DUBEL, S. (1999) Fine mapping of the antigen-antibody interaction of scFv215, a recombinant antibody inhibiting RNA polymerase II from *Drosophila melanogaster*. **J. Molec. Recog.** 12:103-111.

MACHADO DE AVILA, R.A.; ALVARENGA, L.M.; TAVARES, C.A.; MOLINA, F.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.D. (2004) Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by Tityus serrulatus scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. **Toxicon**, 44:233-41.

MANOUTCHARIAN, K.; SOTELO, J.; GARCIA, E.; CANO, A.; GEVORKIAN, G. (1999) Characterization of Cerebrospinal fluid Antibodies Specificities in Neurocysticercosis Using Phage Display Peptide Library. **Clin. Immun.**, 91:117-121.

MANOUTCHARIAN, K.; DÍAZ-OREA, A.; GEVORKIAN, G.; FRAGOSO, G.; ACERO, G.; GONZÁLEZ, E.; DE ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; GÓMEZ-CONDE, E.; SCIUTTO, E. (2004) Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against Taenia solium pig cysticercosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, 99:11-24.

MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; DE SOUZA, W.J.; DE TOLEDO, L.M.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEN, H.; PACHECO, R.D.A.S.; SABROZA, P.C.; DE SOUZA, M.A.; RANGEL JÚNIOR, F.B. (1985). Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, 80:349-57.

MARZOCHI, M.C.; Marzochi, K.B.; Carvalho, R.W.(1994) Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**, ,10:34-37.

MERGENER, J.; BAEHR, R.V.; SCHOMBURG, D.(1993) Structural base of the interaction of a monoclonal antibody against p24 of HIV-1 with its peptide epitope. **Molec. Immun.**, 30:1213-1221.

MERRIFIELD, R. B. (1969) Solid-phase peptide synthesis. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, 32:221-96.

MONTEIRO, S.P.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. (1994) Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revis. Soc. Bras. Med. Trop.**, 27:67-72.

MULLER, I.; PEDRAZZINI, T.; FARRELI,P.;LOUIS, J. (1989) T-cell responses and immunity to experimental infection with *Leishmania major*. **Ann. Rev. Immunol.**, 7:561-578.

NOYA, O.; PATARROYO, M.E.; GUZMÁN, F.; ALARCÓN DE NOYA, B. (2003) Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. **Curr. Protein Pept. Sci.**, 4:299-308.

PADIGEL, U.; ALEXANDER, J., FARREL, J.P. (2003) The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **J. Immunol.**, 171: 3705-3710.

PALATINIK DE SOUZA, C.B. (2008) Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. **Vaccine**, 26:1709—1724.

PAPADOPOULOU B, ROY G, BRETON M, KUNDING C, DUMAS C, FILLIONI, ET AL. (2002) Reduced infectivity of a *Leishmania donovani* bioppterin transporter genetic mutant and its use as an attenuated strain for vaccination. **Infect. Immun.**, 70:62-8.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y.D.; FUCHS, M.; OVERATH, P (1995). The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **J. Cell Sci.**, 108:3715-3724.

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

POSNER, R.G.; FAY, S.P.; DOMALEWSKI, M.D.; SKLAR, L.A.(1994) Continuous spectrofluorometric analysis of formyl peptide receptor ternary complex interactions. **Mol. Pharm.**,45:65-73.

PRINA, E.; JOUANNE, C.; LAO, S.S.; SZABO, A.; GUILLET, J.G.; ANTOINE, J.C.(1993) Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. **J. Immunol.** 151:2050-2061.

RABILLOUD, T.; VUILLARD, L. (1994) Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. **Cell Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)**, 40:57-75.

RASO, P. and GENARO, O. (1994) Patologia das principais doenças tropicais do Brasil- Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Bogliolo Patologia 5ª. Ed. (Eds) G.B. Filho, J.E.H. Pittela, F.E.L. Pereira, E.A. Bambirra, A.J.A. Barbosa. Rio de Janeiro.

REED, S.G.; BADARO, R.; LLOYD, R.D. (1987) Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani* chagasi by human infection sera. **J. Immunol.**, 138:1596-1601.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. (2001) Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annu. Rev. Microbiol.**, 55:453-483.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. (1987). Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. **J. Immunol.**, 139:3118-25.

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

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

SMITH, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, 228:1315-7.

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

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

SOONG, L.; CHANG, C.H.; SUN, J.; LONGLEY Jr., B.L.; RUDDLE, N.H.; FLAVELL, R.A.; McMANTHON-PRATT, D. (1997) Role of CD4+ T-cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J. Immunol.**, 158:5374-5383.

SOUZA, A.E.; BARRES, P.A.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. (1994) Null mutants for the *lmcpa* cysteine proteinase gene in *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 63:213—20.



TAVARES, C.A.; FERNANDES, A.P.; MELO, M.N. (2003) Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Exp. Rev. Molec. Diagn.**, 3:657-667..

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

VALENZUELA, J.G.; BELKAID, Y.; GARFIELD, M.K.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S., ROWTON, E.D.; ET AL. (2001) Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J. Exp. Med.**, 194:331—42.

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

VELEZ, I.D.; GILCHRIST, K.; ARBELAEZ, M.P.; ROJAS, C.A.; PUERTA, J.A.; ANTUNES, C.M.; ET AL. (2005) Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 99:593-8.

WANASEN, N.; XIN, L.; SOONG, L. (2008) Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **Intern. J. Parasit.**, 38:417-429.

WEIGLE, K. and SARAIVA, N.G. (1996) Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in the New World cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol.**, 14:433-450.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2007) The disease and its impact. World Health Organization. <http://who.int/emc/disease/leish/index.html>.2007.

YU, J.; SMITH, G.P. (1996). Affinity maturation of phage-displayed peptide ligands. **Methods Enzymol.** 267:3-27.