



**FIOCRUZ**

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz**

**Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

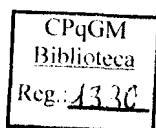
**TESE DE DOUTORADO**

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE  
AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum/chagasi*.  
DESENVOLVIMENTO/OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS  
PARA OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTIGENICIDADE**

**MÁRCIA CRISTINA AQUINO TEIXEIRA**

**RIO DE JANEIRO**

**Novembro, 2004**





Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE  
AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum/chagasi*.  
DESENVOLVIMENTO/OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS  
PARA OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTIGENICIDADE

**MÁRCIA CRISTINA AQUINO TEIXEIRA**

**Orientador: Lain Carlos Pontes de Carvalho**

**Co-orientador: Geraldo Gileno de Sá Oliveira**

Tese apresentada para obtenção do grau de  
Doutor em Biologia Celular e Molecular

**RIO DE JANEIRO**

**2004**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

T266p Teixeira, Márcia Cristina Aquino  
Proteínas recombinantes de amastigotas de *leishmania infantum* /  
*chagasi*. Desenvolvimento/otimização de metodologias para obtenção e  
avaliação de antigenicidade [manuscrito] / Márcia Cristina Aquino  
Teixeira. - 2004.  
108 f. ils : 30 cm.  
Datilografado (fotocópia).  
Tese (doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz,  
2004.  
Orientador: Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, Laboratório de  
Patologia e Biointervenção.  
1. Leishmaniose Visceral -- cães. 2. Resposta imune celular. 3.  
Antígenos recombinantes. I. Título.

CDU 616.993.161:577.27



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Sérgio Gomes Coutinho**

Pesquisador titular - IOC-FIOCRUZ

**Denise Carneiro Lemaire**

Pesquisadora e Professora da Pós-Graduação em Imunologia

Instituto de Ciências da Saúde – UFBA

**Maria Fernanda Rios Grassi**

Pesquisadora Adjunta CPqGM – FIOCRUZ

**SUPLENTE**

**Roque Pacheco de Almeida**

Pesquisador e professor adjunto

FAMED – UFBA

**Roberto José Meyer Nascimento**

Pesquisador e professor adjunto

Instituto de Ciências da Saúde – UFBA

## AGRADECIMENTOS

**Em especial, ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, idealizador deste trabalho, pelo estímulo, orientação, amizade e pelo exemplo de pesquisador.**

Ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira pela co-orientação e participação ativa na obtenção dos antígenos recombinantes de *Leishmania*. O seu entusiasmo e otimismo nas diversas etapas do projeto de desenvolvimento de uma vacina canina para a leishmaniose visceral é realmente contagiante.

Ao Dr. Washington Luis Conrado dos Santos pela orientação nos experimentos descritos no artigo publicado de obtenção de amastigotas de cultivo axênico, e pelas sugestões na revisão de outros manuscritos.

Ao Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos por sua valiosa contribuição como revisor prévio desta tese e aos pesquisadores que aceitaram gentilmente participar da banca examinadora: Dr. Sérgio Gomes Coutinho, Dra. Denise Carneiro Lemaire e Dra. Maria Fernanda Rios Grassi.

A Dra. Neuza Maria Alcântara Neves, pela amizade e incentivo no meu ingresso na pós-graduação. Influência positiva na minha vida profissional.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia do LACEN: Dr. Moacir Paranhos, Lenilson Cardoso, Mahistela de Oliveira Veiga e demais colegas que me incentivaram de alguma forma na conclusão do meu trabalho de tese.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Patologia e Bio-intervenção (LPBI): Paulo Aguiar, Stela, Lenita, Tiana, Neci, Lívia, Sérgio, Patrícia, Andréia, Natanael. Meu agradecimento particular aos veterinários que trabalharam comigo: Virgínia, Daniela, Márcio e Rute. A competência, dedicação e o cuidado de vocês com os cães foram fundamentais no desenvolvimento dos experimentos de imunização/infecção.

A Ana Fiscina Sampaio pela revisão do formato da tese e a todo o pessoal da biblioteca pelo auxílio na busca de referências bibliográficas e pelo carinho com que sempre me ajudaram.

Aos meus familiares e amigos pelo carinho e estímulo.

# SUMÁRIO

## LISTA DE ABREVIATURAS

## RESUMO

## ABSTRACT

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1	ALGUNS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA.....	10
1.2	A EXPANSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL....	11
1.3	IMPORTÂNCIA DO CÃO COMO RESERVATÓRIO DA <i>Leishmania infantum/chagasi</i> .....	12
1.4	MEDIDAS DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL...	13
1.5	RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	14
1.6	VACINAÇÃO NA LEISHMANIOSE .....	15
1.6.1	Relevância dos estudos de vacinação .....	15
1.6.2	Vacinas com parasitos inteiros ou frações protéicas .....	16
1.6.3	Vacinas com moléculas recombinantes .....	17
1.6.4	Vacinas de DNA .....	18
1.7	DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL .....	19
1.7.1	Imunodiagnóstico utilizando proteínas recombinantes .....	20
1.7.2	Imunodiagnóstico utilizando proteínas da família Hsp.....	21
1.7.3	Imunodiagnóstico utilizando proteínas da família das cinesinas	22
1.8	ESTUDOS DE OBTENÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>Leishmania</i> .....	23
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
2.1	OBJETIVO GERAL .....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	26
4	<b>PUBLICAÇÕES</b> .....	27
4.1	ARTIGO I: A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different <i>Leishmania</i> species	29

4.2	ARTIGO II: Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti- <i>Leishmania infantum</i> amastigote antibodies of different animal species .....	35
4.3	ARTIGO III: A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of <i>Leishmania</i> or other pathogens in genetic libraries .....	44
4.4	ARTIGO IV: Immunization protocol to obtain antigen-specific cellular immune responses for the <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> assessments of anti- <i>Leishmania chagasi</i> immune responses in dogs .....	59
5	<b>DISCUSSÃO GERAL DO TRABALHO DE TESE.....</b>	<b>83</b>
6	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
7	<b>AVANÇOS E PERSPECTIVAS DO PRESENTE ESTUDO.....</b>	<b>93</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

A-2	Antígeno 2 de formas amastigotas de <i>L. donovani</i>
BCG	Bacilo de Calmet Guerin
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CPB	Cisteína proteinase do tipo I
DAT	Teste de aglutinação direta
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAST-ELISA	Ensaio imunoenzimático no formato rápido
FML	Ligante da fucose-manose
gp46	Glicoproteína de superfície de 46 kDa de <i>L. major</i>
gp63	Glicoproteína de superfície de 63 kDa de <i>L. major</i>
Hsp 70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
Hsp 90	Proteína de choque térmico de 90 kDa
Hsp 83	Proteína de choque térmico de 83 kDa = Hsp 90
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IFI	Imunofluorescência indireta
IL-2	Interleucina 2
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
K39	Cinesina recombinante de <i>L. chagasi</i> de 39 kDa
LCR1	Antígeno homólogo de antígeno flagelar de <i>Trypanosoma brucei</i>
LeIF	Antígeno homólogo de proteína ribossomal eucariótica
LmSTI1	Antígeno homólogo de proteína de levedura indutora de stress = M15
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LVC	Leishmaniose visceral canina
P-2	Proteína ribossomal ácida
PSA-2	Antígeno 2 de superfície do parasito
rLACK	Receptor de proteína cinase ativada
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
TRALD	Teste rápido de anticorpo contra <i>L. donovani</i>



## RESUMO

**PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE AMASTIGOTAS DE *Leishmania infantum/chagasi*. DESENVOLVIMENTO/OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTIGENICIDADE. MÁRCIA CRISTINA AQUINO TEIXEIRA.** O programa de controle da leishmaniose visceral no Brasil, através da eliminação de cães infectados com *Leishmania*, não produziu resultados satisfatórios. Além da baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos empregados e a demora entre a detecção e a eliminação de cães soropositivos, este tipo de medida enfrenta a pouca aceitação por médicos veterinários e donos dos cães. Apesar do encontro de cães na área endêmica com perfil de resistência à infecção por *Leishmania*, sugerindo que uma vacina é possível, até o presente momento não estão disponíveis vacinas humanas ou para uso veterinário, com eficácia comprovada. Este estudo teve como objetivo a padronização ou desenvolvimento de metodologias para a obtenção e avaliação de proteínas recombinantes de amastigotas de *Leishmania infantum/chagasi*, potencialmente candidatas a componentes de ensaios sorológicos para diagnóstico da LV humana e/ou canina ou de uma vacina para cães contra a infecção por *L. infantum/chagasi*. Inicialmente foi estabelecida a melhor condição de cultivo axênico para obtenção de amastigotas extracelulares de três espécies distintas de *Leishmania*. Apesar de morfologicamente semelhantes às formas amastigotas intracelulares, as formas axênicas de *L. infantum/chagasi* não apresentaram homogeneidade quanto à viabilidade e infectividade, contrastando com o observado com as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Dessa forma, amastigotas purificados de baço de hamsters infectados foram utilizados para purificação do RNA e produção de uma biblioteca de cDNA de *L. infantum/chagasi*. Cinco antígenos recombinantes diferentes foram selecionados da biblioteca de cDNA utilizando uma mistura de soros de cães ou de pacientes com leishmaniose visceral. Os soros dos indivíduos infectados não reativos a esses antígenos foram utilizados para identificar novos clones recombinantes, constituindo uma nova abordagem para obtenção de antígenos com potencial de aumentar a especificidade de um ensaio imunodiagnóstico. A adição dos novos antígenos elevou significativamente a sensibilidade de um ensaio "dipstick" utilizado para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em relação a um painel limitado de soros. Além da utilização de anticorpos produzidos na infecção natural à *Leishmania*, foram testados também protocolos de imunização de três espécies diferentes de animais para a obtenção de anticorpos reativos aos antígenos da biblioteca, potencialmente úteis na seleção ou em processos de purificação das proteínas recombinantes. Os anticorpos produzidos durante a infecção subclínica foram capazes de reconhecer indistintamente proteínas de promastigotas e de amastigotas, apresentando, entretanto, maior reatividade com as formas evolutivas intracelulares, sugerindo que a imunização através da infecção com promastigotas vivos é mais eficiente na indução da produção de anticorpos contra ambos estágios de vida da *Leishmania* do que a injeção de lisados de promastigotas. A infecção subclínica em cães também induziu eficazmente resposta imune celular contra antígenos totais e recombinantes de *L. infantum/chagasi*, como determinado pelos ensaios de linfoproliferação e teste de hipersensibilidade tardia. O protocolo de imunização em cães, testado neste trabalho, pode ser bastante útil na seleção e/ou em ensaios imunobiológicos de antígenos de *Leishmania* promissores para o desenvolvimento de vacinas e/ou métodos imunoterápicos.

**PALAVRAS CHAVES:** Leishmaniose visceral. Imunidade celular. Antígenos recombinantes.

## ABSTRACT

RECOMBINANT PROTEINS FROM AMASTIGOTES OF *Leishmania infantum/chagasi*. DEVELOPMENT/OPTMIZATION OF METHODOLOGIES FOR THE OBTENTION AND AVALIATION OF ANTIGENICITY. **MÁRCIA CRISTINA AQUINO TEIXEIRA**. The control programme for visceral leishmaniosis (VL) in Brazil, through the culling of *Leishmania*-infected dogs has not produced satisfactory results. Besides the low sensitivity of the diagnostic methods applied and the delay between detection and culling of seropositive dogs, this type of measure faces a low acceptance by veterinarians and dog owners. Despite the existence of dogs at the endemic area with a *Leishmania* infection-resistant profile, suggesting that the development of a vaccine is feasible, human- or veterinary-use vaccines with proved efficacy are not yet available. This study had as its objective the standardization or development of methodologies for obtaining and evaluating recombinant proteins of *Leishmania infantum/chagasi* amastigotes, potential candidates to become components of serological assays for the immunodiagnosis of human and/or canine VL, or of a vaccine for dogs against infection by *L. infantum/chagasi*. Initially, the best condition for the axenic cultivation for obtaining extra-cellular amastigotes of three distinct species of *Leishmania* was established. Despite being morphologically similar to the intra-cellular amastigote forms, the axenic forms of *L. infantum/chagasi* were not homogeneous regarding their viability and infectivity, contrasting with that observed with the species *L. braziliensis* and *L. amazonensis*. In this way, purified amastigotes from the spleen of infected hamsters were used for the purification of RNA and the production of a *L. infantum/chagasi* cDNA library. Five different recombinant antigens were selected from the cDNA library through the use of a mixture of dogs' or patients' sera with visceral leishmaniosis. Human sera which are not reactive with these antigens were used to identify new recombinant clones, constituting a new approach for obtaining antigens with potential to increase the specificity of an immunodiagnostic assay. The addition of new antigens increased significantly the sensitivity of a dipstick assay used for the diagnosis of human visceral leishmaniosis, in relation to a limited pannel of sera. In addition to the use of antibodies produced during the natural infection by *Leishmania*, protocols of immunization in three different species of animals were tested, in order to obtain antibodies reacting with antigens from the library, potentially useful in the selection or in purification processes of recombinant proteins. The antibodies produced during a sub-clinical infection were capable of indistinctively recognizing proteins of promastigotes and amastigotes, showing, however, a higher reactivity with the intra-cellular evolutive forms. This suggests that the immunization through infection with live promastigotes is more efficient in inducing the production of antibodies against both life stages of *Leishmania* than the injection of promastigote lysates. The sub-clinical infection in dogs has also efficiently induced a cellular immune response against total and recombinant *L. infantum/chagasi* antigens, as determined through a lymphoproliferative assay and delayed hypersensitivity test. The immunization protocol in dogs, tested in this work, can be very useful in the selection and/or in immuno-biological assays of promising *Leishmania* antigens for the development of vaccines and/or immunotherapeutic methods.

KEY WORDS: Visceral leishmaniosis. Cellular immunity. Recombinant antigens.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ALGUNS ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA

A leishmaniose visceral (LV), conhecida também como febre dun-dun na Índia, calazar infantil na Bacia do Mediterrâneo e calazar ou leishmaniose visceral americana nas Américas, é um crescente problema de saúde pública no Brasil, sendo uma endemia em franca expansão geográfica. O agente etiológico no continente americano é a *Leishmania chagasi*, considerada por alguns pesquisadores indistinguível da *Leishmania infantum* (MAURICIO, 1999; MAURICIO, 2000), o que sugere sua introdução nas Américas através de cães ou indivíduos infectados oriundos da Bacia do Mediterrâneo, adaptando-se ao ciclo parasitário mantido entre homem, cão e inseto vetor.

Contrastando com a leishmaniose visceral causada pela *Leishmania donovani*, a LV causada pela *L. infantum* e *L. chagasi* é uma zoonose (ASHFORD, 2000). Em decorrência do fato da inexistência de dados concretos caracterizando a *L. chagasi* como uma espécie diferente da *L. infantum* (MAURICIO, 2000), e das semelhanças epidemiológicas, parasitológicas e clínicas entre as leishmanioses zoonóticas do Velho e do Novo Mundo, nesta tese será utilizada a denominação *L. infantum/chagasi*, no lugar de *L. chagasi*, para o agente causal da LVA.

O principal vetor da *L. infantum/chagasi* no Brasil é o *Lutzomyia longipalpis*, um inseto da família Psychodidae, de 2-3 mm de comprimento e com hábitos peridomésticos e intradomiciliares, picando o homem ao anoitecer (LAINSON, 1978). A transmissão ocorre quando os flebotomíneos infectados picam os hospedeiros vertebrados, inoculando as formas móveis e alongadas, denominadas de promastigotas, que se transformam em formas arredondadas e imóveis, chamadas de amastigotas, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear.

Assim como as outras espécies do complexo "*Leishmania donovani*", os amastigotas vivem preferencialmente a uma temperatura ao redor de 37° C, causando a invasão de órgãos como baço, fígado, medula óssea e linfonodos, após a inoculação cutânea. O tropismo visceral é o fator determinante da patogenia, levando a hipertrofia e

hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear das vísceras. Os sinais e sintomas caracterizam-se por presença de febre irregular e prolongada, hepatoesplenomegalia, tosse, diarreia, anemia e caquexia (BADARO, 1986), embora a maioria dos indivíduos infectados não apresente manifestações clínicas da doença (HERNANDEZ, 1999). Nas Américas a doença é mais comum entre crianças pobres e desnutridas, sendo esta característica um dos principais fatores de risco (BADARO, 1986; CERF, 1987), levando a uma mortalidade de até 90% em indivíduos não tratados.

## 1.2 A EXPANSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL

A distribuição da LV nas Américas é maior em países como Brasil, Venezuela e Argentina (DESJEUX, 1992; MARZOCHI, 1994; AGUILAR, 1998). No Brasil, cerca de 90% dos casos notificados são oriundos da região Nordeste (ARIAS, 1996), sendo a Bahia a campeã em número de casos humanos dos últimos anos, seguida de perto por Piauí, Maranhão, Ceará e Pernambuco (MARZOCHI, 1994; SESAB-SUS, 2002). A frequência da infecção canina é maior que a humana (DIETZE, 1997), sendo bastante variável, de acordo com a região avaliada. Alguns estudos em cidades brasileiras revelaram prevalências de cães soropositivos de 25% em Guaratiba, Rio de Janeiro (CABRERA, 2003), de aproximadamente 9% em Montes Claros, Minas Gerais (FRANCA-SILVA, 2003), de 23,5% em Jequié, Bahia (PARANHOS-SILVA, 1996) e de 34-37% em Pancas, Espírito Santo (DIETZE, 1997).

Além do incremento na incidência em áreas endêmicas, a urbanização da doença vem sendo observada em cidades de médio e grande porte como Santarém (PA), São Luis (MA), Natal (RN), Aracaju (SE) e Jequié (BA) (SENRA, 1986; COSTA, 1990; JERONIMO, 1994; ARIAS, 1996; PARANHOS-SILVA, 1996). Nas comunidades satélites desses centros urbanos, formadas por indivíduos provenientes de áreas endêmicas, é freqüente a criação de porcos, galinhas e de cães em seus quintais, possivelmente favorecendo um biótopo para povoamento dos flebotomíneos (COSTA, 1990; MOREIRA, 2003). Em áreas antigamente consideradas indenes, como Monte Alegre no Pará e em Roraima (GUERRA, 2004), foram descritos novos focos da infecção a partir da década de 80, provavelmente devido à presença de trabalhadores imigrantes e de seus cães infectados

com *L. infantum/chagasi*. Outro fator preocupante no controle da LV é sua associação com a infecção pelo HIV, determinando em alguns pacientes um quadro de imunodepressão severa (ALVAR, 1997; MOLINA, 2003). A depleção de células CD4<sup>+</sup> induzida pelo HIV pode também modificar alguns aspectos clínicos da LV, incluindo a resposta ao tratamento e a propensão à recidiva (ALVAR, 1997). A co-infecção é resultado da sobreposição geográfica de regiões endêmicas para LV e a SIDA (MOLINA, 2003), devido a infecções primárias com rápida disseminação do parasito em consequência da imunossupressão induzida pelo HIV, ou pela reativação de infecções latentes (ALVAR, 1997; BORGES, 1999).

### 1.3 IMPORTÂNCIA DO CÃO COMO RESERVATÓRIO DA *Leishmania infantum/chagasi*

Na LVA podem ser aceitas três fontes de infecção: cães domésticos parasitados, canídeos silvestres (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*, conhecidos como raposas) e pacientes em fases ativas da infecção ou convalescentes. Apesar de reservatórios como as raposas e marsupiais poderem participar da cadeia de transmissão em ambientes silvestres (CABRERA, 2003), o contato muito maior do ser humano com os cães domésticos do que com estes animais, sugerem pouca participação destes na transmissão da infecção para o homem. Além disso, os cães domésticos costumam acompanhar seus donos na área endêmica e fora dela, contribuindo para a dispersão da doença durante as migrações humanas.

Na natureza, os flebotomíneos têm tanto hábitos antropofílicos quanto zoofílicos, sugando indistintamente o sangue do homem e de animais domésticos como o cão (MORRISON, 1993; BONGIORNO, 2003). Embora não exista uma atração específica do vetor por cães, o intenso parasitismo cutâneo é capaz de produzir altas taxas de infecção de flebótomos, e também tem sido correlacionado positivamente com a evolução clínica da doença (COURTENAY, 2002). Mais ainda, um outro estudo, utilizando o xenodiagnóstico em cães, demonstrou que animais oligossintomáticos ou assintomáticos, podem também ser importantes na transmissão da LV (GUARGA, 2000a). Um ponto importante a ser esclarecido na LVC é a definição do momento em que, devido ao parasitismo cutâneo, o

ção se torna fonte de infecção para o flebotomíneo. Alguns trabalhos apontam para uma transmissão precoce durante a infecção e outros para uma mais tardia (ABRANCHES, 1998), sendo mais fácil quanto menor for o número de células T CD4<sup>+</sup> nos animais infectados (GUARGA, 2000b). Além disso, o encontro de animais infectados sem resposta humoral anti-*Leishmania* (PARANHOS-SILVA, 1996) sugere que a prevalência da LVC, através de inquéritos soropidemiológicos, é subestimada, favorecendo ainda mais a permanência de cães como fonte de infecção para o flebótomo em áreas endêmicas.

Apesar das evidências do papel do cão como importante reservatório doméstico para a *L. infantum/chagasi*, alguns trabalhos sugerem a ocorrência da transmissão homem-flebotomíneo-homem como explicação para a ausência de risco aumentado de LV em crianças morando na mesma casa com cães parasitados (EVANS, 1992), ou para a ineficácia de estudos de intervenção através da eliminação de cães soropositivos (DIETZE, 1997; COSTA, 1997).

#### 1.4 MEDIDAS DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Entre as medidas de controle da LV adotadas no Brasil, estão o diagnóstico e tratamento dos casos humanos, borrifação das casas e quintais com inseticidas com efeito residual e a identificação, seguida da eliminação, de cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*. Esta última medida vem sendo bastante discutida atualmente. Embora programas de erradicação de cães soropositivos tenham sido eficazes na China, Ásia Central em algumas regiões do Mediterrâneo, no Brasil não produziu resultados satisfatórios. Entre 1990 e 1994, mais de 4,5 milhões de cães foram testados pela técnica de imunofluorescência, sendo 80.000 soropositivos eliminados, sem contudo reduzir a incidência da leishmaniose visceral humana no nosso país (COSTA, 2000; COURTENAY, 2002). A ineficácia do programa de eliminação de cães pode ser explicada pela baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos empregados e pela demora entre detecção e eliminação dos cães soropositivos (BRAGA, 1998; REITHINGER, 2002). Este tipo de controle da LVC enfrenta também a pouca aceitação por médicos veterinários e donos dos cães. Estes últimos muitas vezes adquirem e introduzem na área endêmica outros animais jovens e susceptíveis à infecção por *Leishmania*.

Não existem drogas específicas para o tratamento da LVC e testes com drogas humanas não têm obtido resultados satisfatórios. Os animais tratados permanecem como fonte de infecção para o *Lutzomyia* e geralmente sofrem recaídas poucos meses depois do término do tratamento (ALVAR, 1994; DIETZE, 1997). O tratamento em massa de cães com drogas para uso humano poderia também selecionar cepas de *Leishmania* resistentes, além de ter custo elevado e inacessível para países pobres (MODABBER, 1989). Na ausência de um tratamento específico para a LVC, uma medida alternativa testada foi a prevenção da infecção utilizando coleiras impregnadas com inseticidas à base de piretróides. Esta estratégia mostrou uma redução no risco de infecção por *L. infantum* tanto para cães quanto para crianças (GAVGANI, 2002). Entretanto, devido aos custos e as dificuldades de manter permanentemente as coleiras nos cães, o impacto de esta medida como controle da LVC ainda não foi bem avaliada (REITHINGER, 2002; REITHINGER, 2004).

Por todas as dificuldades apresentadas acima, a melhor estratégia no controle da LVC seria o desenvolvimento de uma vacina canina, a qual seria de extrema relevância tanto para o controle epidemiológico da infecção humana, como para utilização em medicina veterinária.

## 1.5 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Estudos sobre a infecção canina natural e experimental indicam que muitos animais desenvolvem infecções assintomáticas, apresentando um perfil de resistência, mesmo em áreas de alta endemicidade para a leishmaniose visceral (CABRAL, 1992; PINELLI, 1994). Entretanto, em contraste à diversidade de estudos sobre a resposta imune na leishmaniose murina (LIEW, 1993), as pesquisas sobre a imunidade na LVC foi prejudicada pela falta de reagentes e de marcadores específicos. Com o recente desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra marcadores celulares de superfície e a clonagem e expressão de citocinas caninas (GUARGA, 2002; SANTOS-GOMES, 2002; DOS SANTOS, 2004), a resposta imune protetora na leishmaniose canina vem progressivamente sendo estudada de forma sistemática. De acordo com os estudos nesta área, o perfil da resposta imune na LVC compartilha algumas semelhanças com aquele apresentado na infecção humana. Linfócitos

de cães sintomáticos de área endêmica apresentaram redução da resposta linfoproliferativa quando estimulados com antígenos parasitários, demonstrando uma supressão da imunidade mediada por células durante a progressão da doença (PINELLI, 1994; DE LUNA, 1999), provavelmente devido a diminuição do número de células T CD4<sup>+</sup> e da produção de TNF e IL-2 (PINELLI, 1994; MORENO, 1999). Por outro lado, cães assintomáticos apresentaram tanto linfoproliferação quanto resposta de hipersensibilidade tardia aumentadas contra antígenos de *Leishmania* (PINELLI, 1994; DE LUNA, 1999). A supressão da linfoproliferação e da resposta celular intradérmica, observada nos animais sintomáticos, é acompanhada na maioria das vezes pelo aumento do título de anticorpos anti-*Leishmania* no plasma, com predominância de IgG2 (BOURDOISEAU, 1997; CABRAL, 1998; CARDOSO, 1998). Os estudos sobre as subclasses de anticorpos IgG produzidos por cães infectados também indicam que a dicotomia Th1/Th2 da resposta imune contra a infecção por *Leishmania*, amplamente estudada em modelos murinos (REED, 1993), ocorre na LVC, na qual IgG1 estaria associada a doença e IgG2 à infecções assintomáticas (DEPLAZES, 1995; BOURDOISEAU, 1997).

## 1.6 VACINAÇÃO NA LEISHMANIOSE

### 1.6.1 Relevância dos estudos de vacinação

A existência de uma vacina ou imunoterápico, que eliminasse a possibilidade do cão servir como fonte de infecção para o flebótomo, seria de grande utilidade no combate a LV por várias razões, como por exemplo: a) uma campanha de vacinação canina seria menos onerosa e mais rápida do que o atual programa de identificação e eliminação dos cães sorologicamente positivos; b) a vacinação apresentaria maior aceitação pela comunidade e pelos médicos veterinários porque evitaria o sacrifício de cães e c) os cães com resistência induzida pela vacinação permaneceriam na área, diminuindo o aporte de novos cães susceptíveis. De fato, modelos matemáticos utilizados na comparação de diferentes medidas de controle da endemia, sugerem que uma vacina canina seria o método mais prático e eficaz (DYE, 1996). Entretanto, apesar da resistência à infecção por *Leishmania*, observada em alguns animais de área endêmica (SOLANO-GALLEGO, 2000), sugerindo



que uma vacina é possível, até o presente momento não estão disponíveis vacinas humanas ou para uso veterinário, com eficácia comprovada.

### 1.6.2 Vacinas com parasitos inteiros ou frações proteicas

Os estudos existentes na área de vacinação de seres humanos e de animais envolvem desde a prática da leishmanização (inoculação de promastigotas vivos de *Leishmania*), a injeção de parasitos mortos ou de clones avirulentos (organismos *knockout*), o uso de frações protéicas do parasito ou de proteínas recombinantes, até vacinas de DNA (HANDMAN, 1997). A medida de inoculação de formas vivas de *Leishmania* no combate à leishmaniose cutânea, adotada por Israel, União Soviética e Irã, vem sendo gradativamente substituída por vacinação com clones avirulentos ou por promastigotas mortas. Em relação ao uso de frações proteicas, moléculas de superfície do parasito como LPG, gp63, gp46 e antígeno 2 de superfície, considerados altamente imunogênicos, foram amplamente testadas em modelos murinos, demonstrando proteção significativa (revisado por HANDMAN, 1997; GRADONI, 2001). Entretanto, os resultados obtidos com os modelos animais e os adjuvantes testados, embora forneçam dados valiosos no estudo da leishmaniose, podem não ser extrapolados para a vacinação humana e/ou canina.

Uma vacina desenvolvida por pesquisadores brasileiros, denominada de "Vacina Terapêutica para a Leishmaniose" vem sendo testada no controle da leishmaniose tegumentar humana no Brasil, Colômbia e Equador. Embora venha sendo utilizada em várias regiões de Minas Gerais, esta vacina ainda não foi autorizada pelo Ministério da Saúde para produção em larga escala e comercialização no país. Uma das limitações é o fato da proteção não exceder a 60% dos indivíduos imunizados (ANTUNES, 1986; MODABBER, 1995). Os ensaios de vacinação de cães ainda são mais escassos e difíceis de serem comparados devido às diferentes metodologias empregadas. Os poucos dados existentes limitam-se principalmente a estudos de Fase I e de Fase II de avaliação de vacinas (revisado por GRADONI, 2001). DUNAN e colaboradores (1989) realizaram um dos trabalhos pioneiros de vacinação de cães com proteínas parcialmente purificadas. Cerca de 400 animais foram injetados com uma fração proteica de 67-94 kDa de *L. infantum* e acompanhados na área endêmica durante dois anos. No primeiro ano após imunização, o

grupo vacinado teve maior incidência tanto da infecção quanto da doença, em relação aos animais não imunizados, sugerindo um aumento da susceptibilidade induzida pelo antígeno. A imunização de cães utilizando promastigotas de *L. major* autoclavadas mais BCG como adjuvante, induziu a uma linfoproliferação específica e prolongada, associada à baixa produção de anticorpos (LASRI, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos na vacinação de cães no Irã, utilizando três doses mensais de *L. infantum* ou *L. major* associadas ao BCG (MOHEBALI, 2004). Uma vacina canina foi testada no Brasil, utilizando *L. braziliensis* e também o BCG como a djuvante. Além de induzir resposta blastogênica a antígenos de *L. chagasi*, a vacinação protegeu os animais contra a infecção após desafio com promastigotas vivos (MAYRINK, 1996). Cães de área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte foram injetados com a vacina fucose-manose ligante (uma fração glicoproteica de *L. donovani*), apresentando resposta humoral e intradérmica a lisado de *L. donovani*. Cerca de 5-8% dos animais vacinados apresentaram sinais do calazar durante o período de observação (DA SILVA, 2000; BORJA-CABRERA, 2002). Apesar dos estudos promissores desenvolvidos no Brasil, ainda não se encontra disponível uma vacina canina contra a LV com eficácia comprovada e de composição química bem definida para utilização em procedimentos de vacinação em massa.

### 1.6.3 Vacinas com moléculas recombinantes

Os avanços na engenharia genética permitiram a produção de moléculas recombinantes que apresentam várias vantagens em relação a proteínas purificadas do parasito, como por exemplo, a facilidade de produção em massa e na padronização dos reagentes e produtos, além de custos menos elevados. Dentre os antígenos recombinantes de *Leishmania*, a gp63 foi um dos mais estudados. Apesar de em diversos modelos murinos essa proteína ter induzido proteção (revisado por GRADONI, 2001), em ensaios *in vitro* com células humanas (VINHAS, 1994) ou com células de macaco (OLOBO, 1995), foram produzidas citocinas do tipo Th2 (não protetoras) ou não ocorreu resposta blastogênica e produção de IFN- $\gamma$  ao estímulo com gp63 recombinante. Por outro lado, a proliferação de células T de cães com infecção por *L. infantum* assintomáticos foi mais intensa quando as culturas foram estimuladas com rgp63 do que com antígeno bruto de *L. infantum*, sugerindo

que, no período pré-patente da infecção, ocorre resposta de células T a epitopos da gp63 (RHALEM, 1999). Um antígeno recombinante homólogo de proteína ribossomal eucariótica, denominado de LelF, foi selecionado de uma biblioteca de cDNA de *L. braziliensis*, utilizando soro de pacientes com leishmaniose mucocutânea. Células desses pacientes estimuladas com LelF foram capazes de produzir citocinas do tipo Th1 (protetoras contra leishmaniose), como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12 (SKEIKY, 1995). Quando utilizado na imunização de BALB/c, posteriormente desafiados com *L. major*, este antígeno induziu apenas proteção parcial dos animais, sendo proposto sua utilização como um adjuvante da resposta Th1 e não como imunógeno principal de uma vacina. Outros antígenos recombinantes selecionados de bibliotecas de cDNA de *Leishmania*, apesar de induzirem uma resposta imune do tipo Th1, falharam em induzir proteção ou protegeram apenas parcialmente camundongos após desafio com promastigotas vivos, como por exemplo, o M15 (= LmSTII; WEBB, 1996), o PSA-2 (HANDMAN, 1995; SJOLANDER, 1998a) e o LCRI (WILSON, 1995). Uma fração de 24 kDa do receptor de proteína cinase ativada (rLACK) recombinante de *L. major*, protegeu camundongos BALB/c, quando injetada com IL-12. Entretanto, ao se administrar LACK isoladamente, os animais desenvolveram uma resposta imune do tipo Th2, levando à exacerbação da infecção (WEBB, 1996; SJOLANDER, 1998b). A indução parcial ou ausência de proteção contra a LV através da imunização de animais com moléculas recombinantes, observada nos estudos descritos acima, e a utilização preferencialmente de modelos experimentais murinos, tornam relevantes a identificação de novos antígenos de *Leishmania* e o desenvolvimento de modelos experimentais caninos que possibilitem a avaliação de moléculas potencialmente protetoras contra a LVC.

#### 1.6.4 Vacinas de DNA

Uma verdadeira revolução no âmbito da vacinação foi o advento das vacinas de DNA como método de controle de doenças infecciosas em homens e animais. A imunidade é induzida através da transfecção de células hospedeiras com plasmídeo contendo o gene de proteínas imunogênicas ou de epitopos antigênicos. Uma vacina de DNA traz implícita uma série de vantagens em relação a antígenos brutos ou parcialmente purificados: facilidade na

produção em larga escala, caracterização molecular bem definida, estabilidade à temperatura ambiente, custos relativamente baixos e indução de memória imunológica prolongada, devido a expressão persistente do antígeno na célula hospedeira (GURUNATHAN, 2000). Ensaio de proteção na leishmaniose utilizando vacinas de DNA apresentam resultados discordantes e limitam-se, na sua maioria, a estudos de vacinação na leishmaniose cutânea e experimental murina (AHMED, 2004). A imunização de BALB/c com DNA de gp63 induziu uma resposta mais intensa do que aquela alcançada pela proteína gp63 purificada (HANDMAN, 1990). A imunidade protetora contra *L. major* foi induzida quando camundongos BALB/c (GURUNATHAN, 1997) foram imunizados com o gene LACK, mas não com LACK recombinante (COELHO, 2003). Proteção parcial também foi observada em cães imunizados com plasmídeo e vírus recombinantes, contendo o gene LACK, e posteriormente desafiados com *L. infantum* (RAMIRO, 2003). Diferentes antígenos (LACK, PSA-2, gp63, LeIF e p20) candidatos a vacinas de DNA foram testados sob as mesmas condições experimentais quanto a capacidade de proteger camundongos BALB/c contra a infecção por *L. major*. O gene LACK truncado (DNA-LACKp24) induziu melhores níveis de proteção em comparação aos outros antígenos (AHMED, 2004). Apesar da indução apenas parcial de proteção observada nos trabalhos descritos, indicando a necessidade de maiores estudos nessa área, esses resultados apontam para uma outra vantagem da vacina de DNA, a de induzir a expressão da proteína na célula hospedeira na sua forma nativa, o que pode ser essencial para o estímulo de imunidade protetora.

## 1.7 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

O diagnóstico clínico da LV é bastante difícil, devido à inespecificidade dos sinais e sintomas. Apesar disto, médicos de áreas rurais de regiões endêmicas ainda baseiam-se nos sinais clínicos para o diagnóstico, levando a confusão com outras doenças co-endêmicas como malária, doença de Chagas e esquistossomose, que também apresentam sinais como febre e hepatoesplenomegalia. O diagnóstico de certeza é dado pela demonstração do parasito em amostras de tecido infectado. Entretanto, o diagnóstico parasitológico requer a realização de procedimentos invasivos, como a punção de medula óssea e de baço, e apesar do aspirado esplênico apresentar um maior número de parasitos, existe um risco elevado de

acidentes hemorrágicos (OREN, 1991). Além disso, para o reconhecimento microscópico de amastigotas, é necessário um profissional bem qualificado, ou como ocorre em casos de baixo parasitismo, a realização de técnicas de cultivo ou de inoculação em animais de laboratório, as quais, por sua vez, exigem materiais e equipamentos não disponíveis na maioria dos laboratórios clínicos. Desta forma, testes sorológicos fáceis, baratos e confiáveis seriam ideais para o diagnóstico da LV, principalmente em áreas rurais e periurbanas de países subdesenvolvidos.

Anticorpos específicos podem ser detectados na leishmaniose visceral precocemente na infecção, ou mesmo meses após cura clínica (WILLIAMS, 1995). Ensaios de detecção de anticorpos podem ser executados com amostras de soro ou de sangue total coletado em papel de filtro durante inquéritos epidemiológicos. Dentre as técnicas mais amplamente adotadas no diagnóstico da LV estão o ELISA e a imunofluorescência indireta (IFI). Vários estudos têm apontado o ELISA como método mais sensível que a imunofluorescência no diagnóstico da LV tanto humana (BADARÓ, 1986) quanto canina (PARANHOS-SILVA, 1996). Apesar da alta especificidade, podem ocorrer resultados falso-positivos (WILLIAMS, 1995), principalmente em baixas diluições do soro, incentivando a busca de antígenos mais promissores para utilização em testes sorológicos.

Além dos diversos ensaios imunoproliféricos e imunoterapêuticos, o ligante da fucose-manose (FML) também foi testado quanto ao seu potencial no imunodiagnóstico da LV. O FML foi utilizado em um ELISA para diagnóstico da LV humana de pacientes brasileiros, apresentando 100% de sensibilidade e 96% de especificidade (PALATNIK-DE-SOUSA, 1995) e de 100% de sensibilidade e de especificidade na LV canina (CABRERA, 1999).

### 1.7.1 Imunodiagnóstico utilizando proteínas recombinantes

Com o advento de novas tecnologias capazes de permitir a clonagem e expressão de genes de diferentes microorganismos, diversos antígenos recombinantes de *Leishmania* têm sido descritos na literatura, sendo utilizados como alvos no desenvolvimento de vacinas e/ou testes imunodiagnósticos.

Proteínas ribossomais ácidas recombinantes, denominadas de P-2, foram utilizadas no diagnóstico da LV humana e canina. Os ensaios com soros humanos demonstraram reatividade cruzada desses antígenos com anticorpos de pacientes com doença de Chagas e lúpus eritematoso sistêmico (SOTO, 1996). Anticorpos anti-proteína recombinante de amastigota A-2 foram detectados em pacientes com LV (GHEDIN, 1997; CARVALHO, 2002) e em cães soropositivos pelo ensaio de imunofluorescência ou com diagnóstico parasitológico confirmado (CARVALHO, 2002). Apesar de não apresentar reação cruzada com outras patologias caninas, o ELISA com rA-2 apresentou baixa sensibilidade, além de não discriminar infecções por *L. mexicana* de *L. donovani* em soros humanos (GHEDIN, 1997; CARVALHO, 2002). Além de funcionar como alvo da resposta imune, uma cisteína proteinase recombinante (CPB), mostrou ser eficaz para uso no diagnóstico de cães infectados, principalmente dos animais assintomáticos (NAKHAEI, 2004).

#### 1.7.2 Imunodiagnóstico utilizando proteínas da família Hsp

As proteínas de choque térmico das famílias Hsp70 e Hsp90 têm sido identificadas como principais imunógenos durante a infecção por *Leishmania*, induzindo tanto resposta celular quanto humoral (MACFARLANE, 1990; DE ANDRADE, 1992; JERONIMO, 1995). Essas proteínas são expressas constitutivamente em todos os estágios do parasito e são altamente imunogênicas. Uma limitação no uso das Hsp no diagnóstico da LV é a possibilidade de reação cruzada com outros parasitos da família Trypanosomatidae, como as espécies de *Leishmania tegumentares* e o *Trypanosoma cruzi*. Embora sejam proteínas altamente conservadas, variações no reconhecimento por soros de pacientes infectados com diferentes espécies visceralizantes foi observado (MACFARLANE, 1990), sugerindo que a clonagem de regiões espécie-específicas seja necessária para uso em imunodiagnóstico. De fato, DE ANDRADE e colaboradores (1992), observaram que apesar da homologia de mais de 80% com as Hsp70 e Hsp90 de *T. cruzi*, soros de pacientes com doença de Chagas não foram capazes de reconhecer as porções C-terminais de Hsp70 e Hsp90 recombinantes de *L. donovani*. Em um outro estudo, os soros de pacientes com Doença de Chagas, malária, esquistossomose e lepra não reconheceram Hsp70 de *L. donovani*, o mesmo não ocorrendo

com soros de cães com VL que reagiram com Hsp de *T. cruzi*, sugerindo que na resposta imune canina a seleção de epitopos não é tão estrita (QUIJADA, 1996a).

As discordâncias nos estudos de especificidade da Hsp70 e seus usos em ensaios imunodiagnósticos induziram os pesquisadores a realizar o mapeamento dos determinantes antigênicos da Hsp70 de *Leishmania infantum*. Peptídeos sintéticos de Hsp70 foram analisados quanto à sua reatividade com soros de cães com infecção natural. O peptídeo H17, de uma das regiões imunodominantes da proteína, mostrou conter um epitopo de célula B espécie-específico, uma vez que não apresentou reação cruzada com Hsp70 de *T. cruzi*, *T. rangeli* e *L. panamensis* (QUIJADA, 1996b). Pesquisadores desse mesmo grupo produziram uma outra proteína de choque térmico recombinante, a LiHsp83 (= Hsp90) e quatro subfragmentos peptídicos para testar soros de cães com VL através do FAST-ELISA. Um fragmento de uma região menos conservada da proteína foi reconhecido por 88% dos soros (ANGEL, 1996).

### 1.7.3 Imunodiagnóstico utilizando proteínas da família das cinesinas

As cinesinas são proteínas motoras associadas a microtúbulos, que estão envolvidas em vários processos celulares como: transporte de organelas e de vesículas sinápticas, segregação de cromossomos, distribuição de proteínas intracelulares e batimentos flagelares (HOWARD, 1997). Uma proteína de amastigotas de *L. chagasi* de 230 kDa, homóloga a proteínas da superfamília das cinesinas, foi descrita pela primeira vez por BURNS e colaboradores (1993). O produto de expressão do gene clonado, a proteína recombinante de 39 kDa (rK39), mostrou conter um epitopo repetitivo bastante conservado entre *L. infantum* e *L. donovani*. De fato, cerca de 98% dos pacientes brasileiros e 100% de pacientes sudaneses com LV apresentaram anticorpos anti-rK39 (BURNS, 1993). Soros de pacientes com diagnóstico parasitológico de LV ou de leishmaniose dérmica pós-calazar indianos (SINGH, 1995) ou pacientes com LV brasileiros (BRAZ, 2002; CARVALHO, 2003), reagiram com rK39 no ELISA. Além de se mostrar um teste sensível e específico, a diminuição do título de anticorpos anti-K39 após quimioterapia, aponta também para o valor prognóstico do rK39-ELISA (SINGH, 1995; BRAZ, 2002). Por outro lado, os títulos baixos de anticorpos anti-K39 em pacientes assintomáticos leva a uma redução da

sensibilidade do ensaio. Além do ELISA tradicional, o rK39 também foi testado nos formatos FAST-ELISA e TRALD (CARVALHO, 2003). Este último, apesar de bastante promissor, principalmente para uso em programas de controle de LV, demonstrou ter baixa sensibilidade, por deixar de detectar formas assintomáticas da doença (BRAZ, 2002). No formato de TRALD, o K39 foi testado em diversos países (HOMMEL, 1999; QU, 2000; ZIJLSTRA, 2001), apresentando resultados bastante variáveis, deixando inclusive de confirmar casos de infecção canina comprovados (ROSATI, 2003). Também no formato de teste imunocromatográfico (Kala-azar Detect Test, Inbios International, Seattle-WA), o rK39 foi testado recentemente com 128 soros de pacientes com aspirados de medula óssea positivos, apresentando sensibilidade de 90% e especificidade de 100% (CARVALHO, 2003). Para corrigir a baixa sensibilidade, os pesquisadores que produziram o K39, adicionaram aos novos ensaios um novo antígeno recombinante, o K26, uma proteína bastante hidrofílica com regiões repetitivas específicas para *L. e hagsi* e *L. donovani* (BHATIA, 1999). Diferentemente do ELISA, o teste imunocromatográfico com rK39 manteve-se positivo em pacientes com até 6 meses após cura (CARVALHO, 2003) ou continuou sendo reconhecido por anticorpos de indivíduos curados por até 24 meses após tratamento (ZIJLSTRA, 2001), indicando uma outra limitação do uso de K39, o fato de não discriminar infecções antigas de doença ativa.

## 1.8 ESTUDOS DE OBTENÇÃO DE FORMAS AMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *Leishmania*

Tanto antígenos de formas amastigotas quanto de formas promastigotas de *Leishmania* têm sido estudados visando desenvolvimento de vacinas e/ou testes imunodiagnósticos para a LV. Amastigotas são as formas evolutivas do parasito responsáveis pela manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado, replicando dentro do vacúolo parasitóforo, levando à destruição de células hospedeiras e invasão de novos macrófagos. Sendo assim, moléculas expressas preferencialmente na forma amastigota têm sido alvos constantes de estudos por diversos pesquisadores. Uma vez que o desenvolvimento de resposta imune protetora na primoinfecção requer um tempo relativamente longo, é mais provável que os antígenos responsáveis por indução deste tipo



de resposta sejam sintetizados por amastigotas e não por promastigotas. Estes últimos podem ser facilmente cultivadas em meios líquidos com temperatura inferior a 28° C (HENDRICKS, 1978) e, portanto, têm sido amplamente utilizados em ensaios bioquímicos e imunológicos. Em contraste, amastigotas intracelulares são obtidos por isolamento de tecido animal infectado (HART, 1981) ou através da infecção *in vitro* de macrófagos (CHANG, 1980). Estes processos são demorados e tendem a fornecer amastigotas contaminados com restos da célula hospedeira. Outra limitação é a pouca quantidade de amastigotas obtida no final do processo de purificação, principalmente quando se trata de *L. braziliensis*, que tem como característica biológica multiplicar-se pouco nas lesões de hospedeiros infectados ou em meios de cultura celular. Esses problemas podem ser contornados pelo uso de amastigotas obtidos de culturas axênicas.

Desde a primeira obtenção bem sucedida de formas amastigotas em meios axênicos (PAN, 1984), diferentes espécies de *Leishmania* têm sido adaptadas para crescimento em meios livres de outros tipos celulares (revisado por PAN, 1993). A diferenciação de promastigotas em amastigotas é conseguida principalmente pelo aumento de temperatura e/ou diminuição do pH (PAN, 1993). Enquanto que espécies do grupo *L. mexicana* parecem se adaptar mais facilmente às condições de cultivo axênico de amastigotas (PAN, 1984), a *L. braziliensis* (HODGKINSON, 1996; BALANCO, 1998) e *L. donovani* (SAAR, 1998) parecem exigir meios mais enriquecidos e aumento gradual de temperatura. Após adaptação dos amastigotas ao cultivo axênico, alguns pesquisadores foram capazes de realizar passagens sucessivas dos amastigotas em meios líquidos (HODGKINSON, 1996).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo a padronização ou desenvolvimento de metodologias para a obtenção e avaliação de proteínas recombinantes de amastigotas de *Leishmania infantum/chagasi*, potencialmente candidatas a componentes de ensaios sorológicos para diagnóstico da LV humana e/ou canina ou de uma vacina para cães contra a infecção por *L. infantum/chagasi*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Obter formas amastigotas puras de *Leishmania* utilizando protocolos de cultivo axênico ou pela purificação de formas intracelulares de tecidos de animais infectados.

2.2.2 Identificar um protocolo eficaz de imunização de animais experimentais (cão, coelho e camundongo) para obtenção de anticorpos específicos para antígenos de amastigotas de *L. infantum/chagasi*.

2.2.3 Selecionar antígenos recombinantes de *L. infantum/chagasi* potencialmente relevantes em ensaios sorológicos para a LV ou para uso em ensaios de proteção contra a LVC.

2.2.4 Avaliar um modelo de imunização de cães que possibilite o estudo *in vitro* e *in vivo* da imunidade mediada por linfócitos T contra antígenos de *L. infantum/chagasi*.

### 3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de métodos não-invasivos, de metodologias simples e de baixos custos para o diagnóstico precoce da leishmaniose visceral ainda é um desafio. Uma vez que altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* são freqüentemente encontrados no soro de pacientes humanos ou cães com LV, testes confiáveis e práticos para diagnóstico sorológico precisam ser desenvolvidos, mesmo para aqueles indivíduos assintomáticos. Os métodos mais utilizados até o presente momento como o ELISA, o FAST-ELISA (ASHFORD, 1993), a IFI, o DAT (GARCEZ, 1996) e o TRALD não são satisfatoriamente sensíveis e/ou específicos. A combinação de vários antígenos, contendo individualmente epitopos imunodominantes, pode incrementar significativamente a sensibilidade e a especificidade dos métodos sorológicos tradicionais de diagnóstico da LV.

Embora estudos utilizando apenas um tipo de proteína parasitária, purificada ou antígeno recombinante, tenham demonstrado induzir proteção contra *Leishmania* em diversos modelos experimentais, é improvável que apenas um único tipo de molécula seja capaz de induzir imunidade protetora ou mesmo de detectar todos os casos de indivíduos infectados com espécies visceralizantes do parasito, devida à variação genética dos mesmos. Para contornar as restrições impostas principalmente pela constituição genética de cada indivíduo e pela especificidade parasitária (diferentes espécies de *Leishmania*), é mais provável que um coquetel de proteínas recombinantes de amastigotas, molecularmente bem definidas, seja necessário tanto para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos, quanto para produção de vacinas ou imunoterápicos contra a leishmaniose visceral.

A produção de bibliotecas de DNA complementar e/ou genômico de *Leishmania* pode fornecer antígenos candidatos a componentes de vacinas ou de métodos sorodiagnósticos, leva a um melhor entendimento da genética molecular do parasito e possibilita estudos de taxonomia através de seqüências gênicas espécies-específicas (YOUNG, 1988; ARORA, 1995). Além de elevar a sensibilidade de testes diagnósticos quando diferentes antígenos são combinados, o uso de proteínas recombinantes reduz a chance de ocorrência de reações cruzadas e permite uma melhor padronização de reagentes, gerando ensaios mais específicos.

## 4 PUBLICAÇÕES

4.1 ARTIGO I: A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species.

### JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO:

Aproximadamente 95% das formas promastigotas são lisadas pela via alternativa do complemento, minutos após a inoculação no hospedeiro pelo *Lutzomyia*. Os parasitos que conseguem escapar deste mecanismo de defesa invadem os macrófagos, sobrevivendo e se multiplicando na forma amastigota, servindo como alvo da resposta imune. Desta forma, é relevante o estudo de antígenos exclusivos da forma parasitária intracelular. Por esta razão decidiu-se neste trabalho de tese utilizar amastigotas como fonte de antígenos a serem estudados. Além disso, era necessário escolher também a espécie de *Leishmania* a ser utilizada. Inicialmente, foram realizados estudos em nosso laboratório comparando-se antígenos brutos de *L. infantum/chagasi* com os de *L. braziliensis* em termos de indução de resposta imune celular em cães. Algumas evidências sugerem que antígenos de *L. braziliensis*, espécie associada a reações imunes exacerbadas (CARVALHO, 1995), sejam mais imunogênicos que os de *L. infantum/chagasi*. Paralelamente a esses estudos, foram iniciados ensaios de obtenção de formas amastigotas de *Leishmania*. Aproveitando os ensaios realizados com amastigotas de *L. infantum/chagasi* e de *L. braziliensis*, foram estudados também neste trabalho de tese, as condições ideais para a diferenciação de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em amastigotas, já que estes últimos foram utilizados em uma outra pesquisa em andamento no laboratório.

Diversos trabalhos foram publicados sobre cultivo de amastigotas em meios axênicos de espécies de *Leishmania* do grupo *L. mexicana* (PAN, 1984; HODGKINSON, 1996), *L. braziliensis* (EPERON & MacMAHON-PRATT, 1989; BALANCO, 1998) e *L. donovani* (AI-BASHIR, 1992; SAAR, 1998). Apesar dos diversos relatos, existem inúmeras divergências sobre os critérios de definição de "amastigota de cultivo axênico" e/ou ausência de informações sobre as condições de cultivo utilizadas, incluindo componentes do meio, pH e temperatura. Os critérios de caracterização mais amplamente

utilizados são: morfologia típica, capacidade de infectar animais ou células de linhagens macrofágicas e a reversão para formas promastigotas. Entretanto, para uma melhor caracterização das amastigotas obtidas em cultivo axênico, é necessário a demonstração de moléculas expressas exclusivamente por amastigotas intracelulares através de análises bioquímicas ou utilizando anticorpos específicos para antígenos deste estágio evolutivo (EPERON & MacMAHON-PRATT, 1989; HODGKINSON, 1996).

O objetivo deste trabalho foi estabelecer as melhores condições de cultivo para obtenção de amastigotas extracelulares de três espécies distintas de *Leishmania*, com particular interesse em *L. braziliensis* e *L. infantum/chagasi*, variando exclusivamente pH, temperatura e concentração de soro bovino fetal no meio de cultura.

## RESULTADOS:

As condições ideais de cultivo axênico de formas amastigotas foram diferentes de acordo com a espécie de *Leishmania* testada, assim como o período ideal para o nível máximo de transformação *in vitro* das formas promastigotas em amastigotas. Um pH básico e tempo maior de cultivo foram exigidos por *L. infantum/chagasi*, enquanto um pH ácido e menos de uma semana de cultivo foram suficientes para a diferenciação de promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* em amastigotas de cultivo axênico. Apesar das exigências espécie-específicas, a obtenção de formas semelhantes a amastigotas na cultura axênica foi bastante elevada, variando de no mínimo 90% (*L. infantum/chagasi*), até 97% (*L. amazonensis*) ou 98% (*L. braziliensis*) do total de parasitos. As formas axênicas foram semelhantes morfologicamente a amastigotas intracelulares tanto em nível de microscopia óptica quanto eletrônica, foram capazes de reverter para promastigotas, e mantiveram a virulência para camundongos BALB/c. Além disso, alguns antígenos foram reconhecidos por anticorpos policlonais apenas nas formas amastigotas de cultivo axênico e de lesão, podendo servir de alvos em estudos de moléculas estágio-específicas com capacidade imunomoduladora ou com valor imunoprolático contra a leishmaniose.

Márcia Cristina Aquino Teixeira  
Regilene de Jesus Santos · Romina Barreto Sampaio  
Lain Pontes-de-Carvalho · Washington L.C. dos-Santos

## A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species

Received: 17 April 2002 / Accepted: 14 May 2002 / Published online: 6 July 2002  
© Springer-Verlag 2002

**Abstract** This work describes a simple method to yield large amounts of *Leishmania* amastigote-like forms in axenic cultures using promastigotes as the starting population. The method described induced extracellular amastigote transformation of *Leishmania amazonensis* (97%), *Leishmania braziliensis* (98%) and *Leishmania chagasi* (90%). The rounded parasites obtained in axenic cultures were morphologically similar, even at the ultrastructural level, to intracellular amastigotes. Moreover, the axenic amastigotes remained viable as measured by their ability to revert back to promastigotes and to infect BALB/c mice. *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes and axenic amastigotes differed in terms of their Western blot profiles. A 46 kDa protein was recognized by specific antibodies only in axenic and lesion-derived *L. amazonensis* amastigotes and not in promastigotes.

### Introduction

Protozoa of the genus *Leishmania* display two distinct morphological and three distinct physiological forms. The promastigotes, the flagellated stages, infect the sand fly vector both as a multiplying and also as a mammal-infective form (Sacks 1992) whereas the non-flagellated

amastigote resides in mammalian macrophage phagolysosomes. Both morphological stages are responsible for the pathology in their respective hosts (Chang and Dyer 1976; Schlein et al. 1992). The promastigote stages can be easily cultivated in different types of media (Hendricks et al. 1978; Hart et al. 1981; Jaffe et al. 1984) and are frequently used in scientific studies. In contrast, the difficulty in obtaining large numbers of amastigotes, free from host cell contaminants, has hampered the investigation of their metabolic, biochemical and biological properties (Chang 1980; Hart et al. 1981). Moreover, a study on macrophage receptors for *Leishmania* demonstrated the presence of host immunoglobulins on the surface of lesion-derived amastigotes (Peters et al. 1995), something that would particularly hinder their use in biological and immunological studies.

The first successful long-term propagation of amastigote-like forms of *Leishmania*, namely *Leishmania pifanoi*, in a cell-free medium was reported by Pan (1984). Since then, attempts at the cultivation of amastigotes in cell free media have been carried out by many authors (reviewed in Bates 1993; Pan et al. 1993). Some reports have focused on the in vitro transformation of promastigotes to amastigote-like forms in response to elevated temperature (Hendricks 1978; Hunter et al. 1982; Leon et al. 1995), whereas few authors have described serial axenic cultivation of the intracellular stage (Pan 1984; Al-Bashir et al. 1992; Hodgkinson et al. 1996). The axenic cultivation of amastigotes of *Leishmania mexicana* has been more effective than that of other species of *Leishmania* (Bates 1993). Some authors have reported *Leishmania donovani* amastigote transformation in axenic cultures (Al-Bashir et al. 1992; Saar et al. 1998), whereas there is only one study on the differentiation to axenic amastigotes of *Leishmania chagasi*, another visceral species (Leon et al. 1995).

In spite of these reports on the axenic cultivation of *Leishmania* amastigotes, there still remain controversies about the reproducibility and/or timing of parasite transformations. In this paper, a simple and quick method of obtaining up to  $4 \times 10^7$  axenic amastigotes/ml

M.C.A. Teixeira · R. de Jesus Santos · R.B. Sampaio  
L. Pontes-de-Carvalho · W.L.C. dos-Santos (✉)  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz,  
Av. Waldemar Falcão 121, 40295-001, Salvador, Brazil  
E-mail: wlusta@cpumet.com.br  
Tel: + 55-71-3568781  
Fax: + 55-71-3562155

M.C.A. Teixeira  
Laboratório Central de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz,  
Av. Wakklemar Falcão 123, 40295-001, Salvador, Brazil

R. de Jesus Santos · L. Pontes-de-Carvalho · W.L.C. dos-Santos  
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,  
Av. Dom João VI 274, 40290-000, Salvador, Brazil

of culture is described, providing large amounts of pure and viable parasites. This method may obviate the need for using experimental laboratory animals to obtain amastigotes and the laborious procedures for intracellular parasite purification.

## Materials and methods

### Parasites and culture

The *Leishmania* species used were isolated from human patients and identified as *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain), *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/3456) and *Leishmania chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2 strain). They were kept by passaging in golden hamsters. The cultures were grown at 22°C in Schneider's *Drosophila* medium (Sigma, St. Louis, Mo., USA), pH 7.2, supplemented with either 10% fetal calf serum (FCS; Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA) for *L. amazonensis* or 20% FCS for *L. braziliensis* and *L. chagasi*. The promastigotes used to initialize amastigote axenic cultures were maintained in cultures for no more than ten passages. Different culture conditions for promastigote transformation in relation to: pH (5.4, 6.4 and 7.2), temperature (32°, 34°, 35° and 37°C) and FCS concentration (2.5%, 5%, 10% and 20%), were tested. To determine growth curves, parasite cultures were initiated at a concentration of  $5 \times 10^6$  promastigotes/ml in 25 cm<sup>3</sup> tissue culture flasks containing 5 ml of medium. Cell density was estimated using a haemocytometer. To disrupt the aggregates which were formed mainly in *L. braziliensis* cultures, parasites were passed through a 25-gauge needle before counting. Intracellular amastigotes were isolated from footpad lesions of infected hamsters and purified using a Percoll (Sigma) gradient, as previously reported (Chang 1980).

### Morphological assessment

To evaluate the morphology of transformed parasites, axenic amastigotes were harvested from cultures and either smeared onto slides for Giemsa staining or spun down in Eppendorf tubes for electron microscopy. The supernatant was discarded and the pellets were fixed for 1 h at 4°C with 2% glutaraldehyde. Parasites were pelleted, post-fixed with 1% osmium tetroxide for 30 min at room temperature, dehydrated in ethanol-propylene oxide series and embedded in Spurr resin. After polymerization, ultrathin sections were collected in copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined on a Zeiss EM109 electron microscope at 30 kV.

### Western blot analysis

Lysates of promastigotes, amastigotes from lesions and axenic amastigotes were subjected to 10% polyacrylamide gel electrophoresis (Laemmli 1970). Lysates from different forms of the same *Leishmania* species were run in the same gel and a total of  $10^7$  lysed parasites of each *Leishmania* stage was loaded per lane. The separated proteins were analyzed by Western blot as described elsewhere (Balanco et al. 1998), utilizing an 1:200 dilution of a pool of five sera from mice chronically infected with *L. amazonensis*.

### Functional studies

The viability and functional status of amastigote-like forms were tested by assessing their ability to revert back to promastigotes and to infect mice. Reversion to promastigotes was accomplished by washing the parasites three times in 0.15 M phosphate-buffered saline (pH 7.2) and transferring them to Schneider's medium

with 10–20% FCS, pH 7.2, at 22°C. To evaluate infectivity, axenic amastigotes and promastigotes of *L. braziliensis* and *L. amazonensis* were inoculated into BALB/c mouse hind footpads. The BALB/c mice were obtained from the Gonçalo Moniz Research Center animal facilities, and were maintained under specific pathogen-free conditions, with balanced mouse food and water ad libitum. The infection experiments were conducted in accordance with the Oswaldo Cruz Foundation guidelines for experimentation with animals.

## Results

### Cultivation of amastigote-like forms

The first aim of this study was to monitor parasite growth and transformation in axenic cultures in order to establish the best conditions for obtaining amastigote-like forms. Starting with a 100% promastigote population and using Schneider's medium, cultures were subjected to variations in pH, temperature and concentration of FCS to obtain the maximal rate of transformation for each *Leishmania* species. For *L. braziliensis*, a high proportion (98%) of amastigote-like forms were observed in 3-day cultures supplemented with 20% FCS, at pH 5.4 and carried out at 34°C (Fig. 1a). *L. amazonensis* parasites had similar levels of differentiation into amastigote-like forms (97%) by the 7th to 10th days of culture in Schneider's medium with 5% FCS, pH 5.4, at 32°C (Fig. 1b). For *L. chagasi*, 90% of the promastigotes transformed into amastigote-like forms after 13 days of axenic culture in Schneider's with 20% FCS, pH 7.2 and at 35°C (Fig. 1c). Table 1 summarizes the best culture conditions for obtaining amastigote-like forms for each *Leishmania* species.

### Morphology under light and electron microscopy

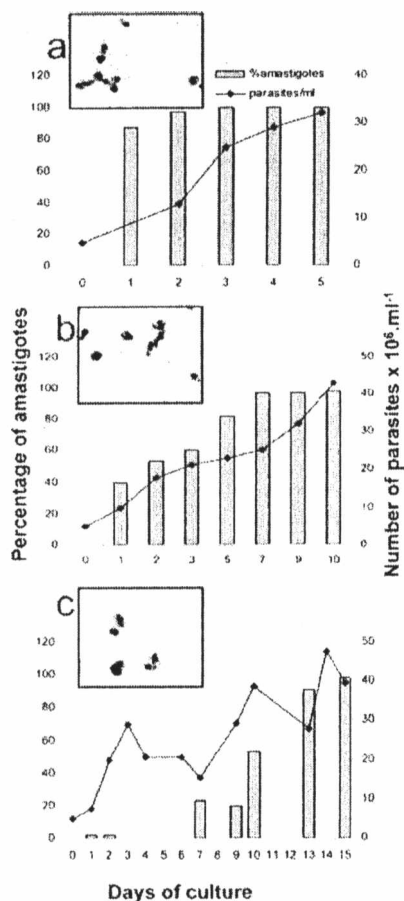
Optical microscopy of Giemsa-stained amastigote-like forms of the three *Leishmania* species studied revealed oval or pyriform cells lacking a free flagellum. Dividing amastigotes with two nuclei and two kinetoplasts could readily be observed in *L. amazonensis*, less frequently in *L. braziliensis* and even less frequently in *L. chagasi* cultures (not shown). The non-motile, oval forms of *L. braziliensis* from the 3rd day of axenic culture also had an amastigote morphology at the ultrastructural level, e.g. a non-emergent flagellum inside the flagellar pocket (Fig. 2).

### Viability of axenic amastigotes

Axenic amastigotes of all three *Leishmania* species were able to revert back to promastigotes when cultured under suitable conditions. The proportion transforming was high, as shown by the absence or low numbers of either amastigotes or dead cells in *L. braziliensis* (Fig. 3) and *L. amazonensis* cultures (less than 10%), and in *L. chagasi* cultures (less than 30%, mostly due to the

presence of dead cells/cell debris). In addition, BALB/c mice could be infected in the hind footpads both with axenic amastigote-derived promastigotes or axenic amastigotes, as *L. braziliensis* and *L. amazonensis* could be isolated 2–3 months later from skin lesions and from draining lymph nodes of infected mice. The development

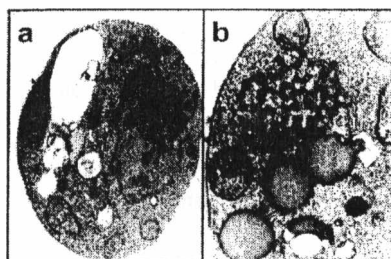
of lesions in BALB/c mice infected with *L. amazonensis* axenic amastigotes was similar to that observed in promastigote-infected mice (Fig. 4). In fact, two of the three mice infected with axenic amastigotes developed lesions



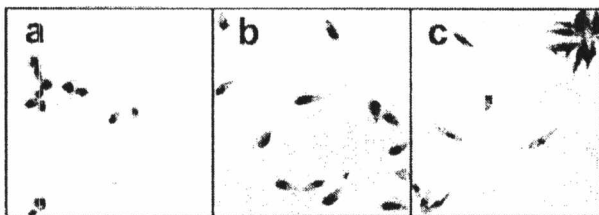
**Fig. 1.** In vitro growth of *Leishmania* amastigotes in axenic cultures: **a** *L. braziliensis*, **b** *L. amazonensis* and **c** *L. chagasi*. Cultures were initiated with  $5 \times 10^6$  promastigotes/ml and kept under the specific conditions described in the Materials and methods section. Lozenges represent the number of parasites as determined by counting in a haemocytometer, and bars represent the percentages of amastigote-like forms. Insets show the typical oval- or elliptical-shape axenic amastigotes of each *Leishmania* species (Giemsa,  $\times 4,800$ )

**Table 1.** Axenic culture conditions, in Schneider's medium, for the transformation of *Leishmania* promastigotes into amastigote-like organisms

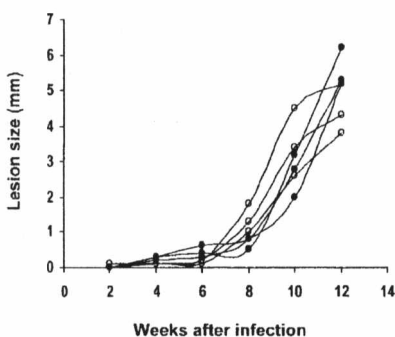
Species	Temperature	pH	FCS	Days of culture	Percent amastigotes
<i>L. braziliensis</i>	34°C	5.4	20%	3	98%
<i>L. amazonensis</i>	32°C	5.4	5%	7	97%
<i>L. chagasi</i>	35°C	7.2	20%	13	90%



**Fig. 2a, b.** Electron micrograph of *L. braziliensis* amastigote-like forms from axenic cultures. *L. braziliensis* promastigotes were cultivated in Schneider's medium with 20% of FCS, pH 5.4 and at 34°C. After 3 days, parasites were harvested from cultures and fixed with glutaraldehyde. Note the non-emergent flagellum inside the flagellar pocket (**a**  $\times 34,800$ ) and lipids droplets in cytoplasm (**b**  $\times 41,500$ )



**Fig. 3a–c.** *L. braziliensis* amastigote-like forms revert to promastigotes. Axenic amastigotes of *L. braziliensis* were subjected to suitable conditions for transformation to promastigotes and monitored daily by optical microscopy after staining. **a** Axenic amastigotes in Schneider's with 20% FCS at pH 5.4 and 34°C; **b** 3-day culture and **c** 4-day culture in Schneider's medium with 20% FCS at pH 7.2 and 22°C (Giemsa,  $\times 4,800$ )



**Fig. 4.** Infectivity of axenic amastigotes. Groups of three BALB/c mice were infected in hind footpads with either  $10^5$  axenic amastigotes (closed circles) or  $10^5$  promastigotes (open circles) of *Leishmania amazonensis*. Lesion sizes were calculated by subtracting the widths of uninfected from infected footpads. Each curve corresponds to data obtained from an individual animal. Data are representative of two experiments



slightly larger than those observed in mice infected with promastigotes (Fig. 4).

#### Stability of axenic amastigotes in culture

The non-motile and ovoid shaped forms of *L. amazonensis* proliferated in culture and could be inoculated into fresh medium and expanded at least twice. After 3 days, no promastigotes could be detected in *L. braziliensis* axenic cultures. However, the parasites demonstrated morphological signs of cell injury and started to die by the 5th day of culture. By the 15th day of culture, most of the *L. chagasi* axenic amastigotes were morphologically unhealthy (they had an irregular cytoplasm and a fragmented nucleus).

#### Recognition of *Leishmania* proteins by antiserum

The anti-*L. amazonensis* serum recognized a 46 kDa protein in *L. amazonensis* amastigotes (axenic and lesion-derived), but not in promastigotes (Fig. 5). At least three bands corresponding to proteins with apparent molecular weights larger than 84 kDa were observed in axenic, but not in lesion *L. amazonensis* amastigotes. Faint bands between 28 and 32 kDa were revealed only in lesion-derived *L. amazonensis* amastigotes, whereas a single band of around 30 kDa appeared in both axenic amastigotes and promastigotes. A 65 kDa protein was strongly recognized in *L. braziliensis* promastigotes and very weakly in axenic amastigotes and bands of 113 and 117 kDa were present only in promastigotes.

#### Discussion

In this report, the conditions for the production of large numbers of axenic amastigotes of *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. chagasi* using Schneider's medium are described. The morphological and ultrastructural characteristics of the axenic amastigotes were very similar to those of lesion amastigotes and their propagation was neither time-consuming nor technically demanding. The amastigote-like forms were viable and expressed stage-specific antigens.

Some authors have accomplished the serial cultivation of *Leishmania* axenic amastigotes in cell-free medium with a complex composition, including a mixture of nucleotides and vitamins (Pan 1984), or with different protein sources and rabbit blood lysate (Al-Bashir et al. 1992). The diversity of reagents in the prepared media may impede the reproducibility of the results in different laboratories. In fact, we have carefully tested the RBLM medium for axenic amastigotes, as described elsewhere (Al-Bashir et al. 1992), without success for any of the three *Leishmania* species studied (data not shown).

Specific requirements for temperature, pH and concentration of FCS were observed for the three species of *Leishmania* studied, indicating that culture conditions for amastigote differentiation in cell-free media is species dependent. For example, a relatively low pH (5.4) in the medium was required for the transformation of *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, but not of *L. chagasi*. At pH 5.4, the maximum rate of promastigote transformation of this species was 26% (4-day culture) and the cells died by the 6th day of culture (data not shown). This was in contrast to 90% transformation at pH 7.2 (13-day culture) under the same conditions. These specific requirements demonstrate differences in pH and temperature sensitivities among *Leishmania* species.

Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in South America are mainly caused by *L. braziliensis* (Grimaldi et al. 1989). This species differs from others by the presence of small numbers of amastigotes in the lesions, hindering their isolation from tissue. Indeed, this very paucity of *L. braziliensis* amastigotes in skin lesions prevented their purification in large enough numbers to allow their comparison with axenic culture-derived amastigotes in the present study. Therefore, obtaining extracellular *L. braziliensis* amastigotes forms would facilitate a number of biochemical and immunological studies on this parasite. Eperon and McMahon-Pratt (1989) have previously reported the transformation of *L. braziliensis* promastigotes to amastigotes in Schneider's medium at 28°C, without indicating the culture pH. In their study, an acclimatization period and a slow increase in temperature was necessary. Balanco and collaborators (1998) have also obtained *L. braziliensis* amastigotes in axenic cultures using a different medium (UM-54) at 34°C and pH 6.3. With the 2°C increments in temperature, 1 week was required to obtain 95% of amastigote-like forms in culture. As described herein, a rapid and high proportion (98%) of differentiation of *L. braziliensis* promastigotes into amastigote-like forms was observed, without changes in pH or temperature during cultivation.

The culture conditions to obtain axenic amastigotes of *L. amazonensis* described here are an adaptation of those reported by Hodgkinson and collaborators (1996). In order to obtain stable amastigote-like populations, these authors increased the temperature by 2°C intervals, followed by decreases of 0.5 pH units down to pH 5.0 and then of 0.2 pH units until pH 4.6 was reached. In the study described here, *L. amazonensis* differentiation was gradual and took at least 7 days to reach maximal levels at pH 5.4, without any changes in culture conditions.

In order to obtain *L. chagasi* amastigote forms, the cultivation of promastigotes at 37°C and/or at an acidic pH was first tested. None of these conditions led to parasite transformation or growth. It was necessary to decrease the temperature to 35°C and increase the pH to 7.2 in order to stimulate differentiation which took at least 13 days to reach maximal levels. Dividing amasti-

gote-like forms were easily observed in *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, but very infrequently in *L. chagasi* axenic cultures. This fact, taken together with the relatively long time (13 days) needed for *L. chagasi* promastigote differentiation, with a lower proportion (maximal of 90%) of axenic amastigotes in comparison with *L. amazonensis* (97%) and *L. braziliensis* (98%) axenic amastigote cultures, and the presence of more cell debris in amastigote-derived promastigote cultures, may indicate that *L. chagasi* is more fastidious than the other two *Leishmania* species in terms of its requirements for in vitro stage transformation.

The good condition of the axenic culture-derived amastigotes was evaluated by four different criteria. First, all three *Leishmania* species amastigotes had a regular, smooth morphological appearance. Second, *L. amazonensis* amastigotes could be subcultured, leading to a progressive increase in the homogeneity of the amastigote-like population, with the absence of promastigotes. Third, the axenic amastigotes of all three species were able to revert back to promastigotes. Fourth, *L. braziliensis* and *L. amazonensis* axenic amastigotes kept their viability and infectivity to mice by the time (3 and 10 days, respectively) of the maximal ratio of transformation in culture, without signs of cellular death.

Despite their homogeneous morphology, *L. amazonensis* axenic amastigotes displayed a Western blot profile intermediate between promastigotes and intracellular amastigotes. A protein of 46 kDa from *L. amazonensis*, recognized by serum from infected BALB/c mice, was present only in the axenic and lesion amastigotes. This protein may correspond to a 46 kDa protein that was detected in *Leishmania infantum* axenic amastigotes using sera from human beings and dogs with visceral leishmaniasis (Cibrelus 1999), to a 45 kDa band which was recognized in *L. donovani* using a monoclonal antibody specific to the A-2 multi-gene family of proteins, expressed only in amastigotes (Saar et al. 1998) and/or to a 45 kDa protein of *L. pifanoi* detected with a monoclonal antibody in both axenic and intracellular amastigotes by Pan and collaborators (1993). *L. amazonensis* proteins with apparent molecular weights of 23 and 30 kDa were recognized in both axenic promastigotes and axenic amastigotes, a fact that may be explained by the presence in amastigote axenic cultures of intermediate forms expressing some proteins of the promastigote stage. In this study, proteins around 30 kDa were recognized by antiserum in all three morphological forms. Colmenares and collaborators (2001) have identified a *L. pifanoi* 31 kDa protein, recognized by an amastigote-specific monoclonal antibody, as a cystein proteinase associated with glycolipids. Either the 30 kDa seen in axenic amastigotes or the 32 kDa protein seen in lesion-derived amastigotes could be that cystein proteinase.

The different methods applied for the characterization of *Leishmania* molecules, such as Western blot and radioimmunoprecipitation using monoclonal antibodies

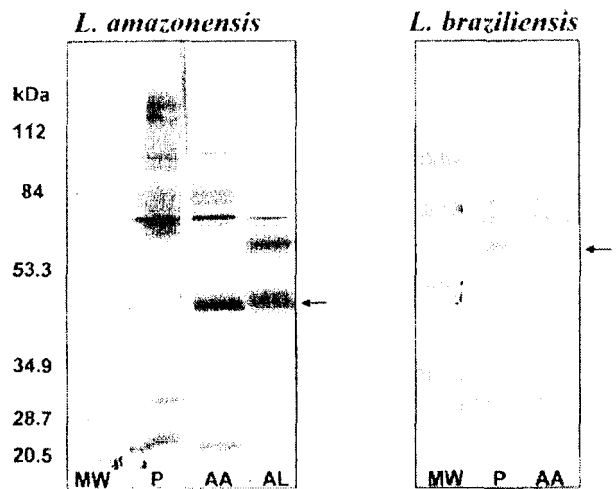


Fig. 5. Reactivity of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* antigens with polyclonal antibodies. Lysates of promastigotes (P), axenic amastigotes (AA) and amastigotes from lesions (AL) were analysed by Western blot using sera from *Leishmania*-infected BALB/c mice. The positions of molecular weight (MW) standards are indicated on the left. Arrows indicate the high expression of a 46 kDa protein in *L. amazonensis* amastigotes and the under expression of a 65 kDa protein in *L. braziliensis* axenic amastigotes.

(Hodgkinson et al. 1996; Pan and McMahon-Pratt 1988), surface radioiodination (Balanco et al. 1997) or Western blot using polyclonal anti-*L. amazonensis* sera (this report) may account for the distinct group of molecules demonstrated in different studies.

Only *L. braziliensis* axenic amastigotes and promastigotes were compared in terms of recognition patterns by specific antibodies (Fig. 5b) due to the difficulties in obtaining intracellular amastigotes from the pad lesions of infected hamsters. A protein of 65 kDa, which was recognized by specific antibodies more intensely in promastigotes, could indeed be the gp65, and its down-regulation in axenic amastigotes shown here is consistent with previously reported data (Kweider et al. 1989). A reduction in intensity of a 117 kDa protein in promastigote-derived amastigotes is also consistent with its down-regulation at this stage.

Axenic amastigotes may be useful for the study of molecules selectively expressed by them and by intracellular amastigotes. The availability of a pure amastigote preparation from different *Leishmania* species would also facilitate studies aimed at identifying the *Leishmania* molecules involved in the modulation of chronic infection and/or of potential immunotherapeutic or immunoprophylactic value, as promastigotes enter into contact with the host only for very short periods.

**Acknowledgements** This work was supported by the Brazilian Ministry of Science and Technology (National Research Council-CNPq and Program for Nucleus of Excellence-PRONEX) and by the Bahia State Government (CADCT).

## References

- Al-Bashir NT, Rassam MB, Al-Rawi BM (1992) Axenic cultivation of amastigotes of *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and their infectivity. *Ann Trop Med Parasitol* 86:487-502
- Balanco JMF, Pral EMF, da Silva S, Bijovsky AT, Mortara RA, Allieri SC (1998) Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like forms. *Parasitology* 116:103-113
- Bates PA (1993) Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. *Parasitol Today* 9:143-146
- Chang KP (1980) Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science* 209:1240-1242
- Chang KP, Dwyer DM (1976) Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vivo. *Science* 193:678-80
- Cibrelus P, Précigout E, Sereno D, Carey B, Lemesre JL, Gorenflot A (1999) Secreted antigens of the amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum* inducing a humoral response in humans and dogs. *Parasite* 6:121-129
- Colmenares M, Tiemeyer M, Kima P, McMahon-Pratt D (2001) Biochemical and biological characterization of the protective *Leishmania pifanoi* amastigote antigen P-8. *Infect Immun* 69:6776-6784
- Eperon S, McMahon-Pratt D (1989) Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. *Protozoology* 36:502-510
- Grimaldi G Jr, Tesh RB, 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
- Hart DT, Vickerman K, Coombs GH (1981) A quick simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbers. *Parasitology* 82:345-355
- Hendricks LD, Wood DE, Hajduk ME (1978) Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76:309-316
- Hodgkinson VW, Soong I, Duboise SM, McMahon-Pratt D (1996) *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp Parasitol* 83:94-105
- Hunter KW, Cook CL, Hensen SA (1982) Temperature-induced in vitro transformation of *Leishmania mexicana*. I. Ultrastructural comparison of culture-transformed and intracellular amastigotes. *Acta Trop* 39:143-150
- Jaffe CL, Grimaldi G, McMahon-Pratt D (1984) The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel CM (ed) *Genes and antigens of parasites*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro
- Kweider M, Lemesre JL, Santoro F, Kusnierz JP, Sadigursky M, Capron A (1989) Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. *Parasite Immunol* 11:197-209
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Leon LL, Soares MI, Temporal RM (1995) Effects of temperature on promastigotes of several species of *Leishmania*. *J Eukaryot Microbiol* 42:219-223
- Pan AA (1984) *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp Parasitol* 58:72-80
- Pan AA, McMahon-Pratt D (1988) Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of *Leishmania pifanoi* I. Characterization of antigens associated with stage- and species-specific determinants. *J Immunol* 140:2406-2414
- Pan AA, Duboise SM, Eperon S, Rivas L, Hodgkinson V, Traub-Cseko Y, McMahon-Pratt D (1993) Developmental life cycle of *Leishmania*-cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. *J Eukaryot Microbiol* 40:213-223
- Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M, Overath P (1995) The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci* 108:3715-3724
- Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazurek S, Amin-Spector S, Plumblee J, Turco SJ, Zilberstein D (1998) Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 95:9-20
- Sacks DL (1992) The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infect Agents Dis* 1:200-206
- Schlein Y, Jacobson RL, Messer G (1992) *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite. *Proc Nat Acad Sci U S A* 89:9944-9948

## 4.2 ARTIGO II: Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-*Leishmania chagasi* amastigote antibodies of different animal species.

### JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO:

Estudos sobre a resposta imune humoral a antígenos estágio-específicos de *Leishmania*, através de Western blot, têm demonstrado um perfil antigênico diferente entre as formas amastigotas e promastigotas (SAAR, 1998; CIBRELUS, 1999). A imunização de animais para a obtenção de altos títulos de anticorpos policlonais ou para a produção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais reativos com formas amastigotas, são de grande utilidade em diversos estudos. Esses anticorpos podem, por exemplo, ser utilizados para a identificação de amastigotas em lesões ou de antígenos parasitários secretados no sangue e/ou urina, para protocolos de purificação de proteínas de *Leishmania* por imunoprecipitação ou imunocromatografia ou para estudos de classificação taxonômica.

Neste trabalho de tese, visamos desenvolver um bom método para obtenção de anticorpos anti-amastigotas de *Leishmania* que pudessem ser utilizados na detecção de antígenos de uma biblioteca de cDNA de *L. infantum/chagasi* e/ou em protocolos de purificação de proteínas por imunoafinidade. O cão foi escolhido por ser o principal reservatório doméstico da *L. infantum/chagasi* e, portanto, um dos alvos de métodos para imunodiagnóstico da LV canina ou de ensaios de vacinação como medidas de controle da leishmaniose. Soros desses animais poderiam reconhecer antígenos potencialmente indutores de resposta imune protetora contra a infecção. O coelho foi utilizado principalmente por ser um animal refratário à infecção e produzir altos títulos de anticorpos (RASSAM, 1984) os quais poderiam ser úteis em diversos ensaios de triagem de antígenos em bibliotecas gênicas e na identificação ou purificação dos produtos de expressão dos clones recombinantes.

Este artigo contempla, ainda, a padronização dos protocolos de imunização de camundongos para a produção de hibridomas, e a caracterização de anticorpos monoclonais anti-*Leishmania* produzidos, que foram parte das teses de mestrado de Cláudia V. D. dos Santos (SANTOS, 2001) e Manoel L. Penha Filho (PENHA-FILHO, 2003).

## RESULTADOS:

Os cães imunizados por via subcutânea com lisado de promastigotas de *L. infantum* produziram baixa atividade de anticorpos específicos em um ELISA. O termo “atividade” de anticorpo é utilizado nesta tese e não “concentração” ou “quantidade” de anticorpo porque o que se mediu no ELISA foi exatamente a atividade de anticorpo (anti-antígeno), que depende tanto da concentração quanto da afinidade do anticorpo.

A subsequente inoculação dos animais com promastigotas vivos induziu uma elevação significativa da atividade de anticorpos anti-*Leishmania*, os quais reagiram com ambas formas evolutivas do parasito, porém mais intensamente com os amastigotas do que com os promastigotas.

A imunização de coelhos por via subcutânea com lisado de amastigotas levou à produção preferencial de anticorpos contra esse estágio parasitário. Por outro lado, a injeção de promastigotas nos coelhos por via endovenosa estimulou a produção de anticorpos contra as duas formas evolutivas, mas, como observado em cães, com maior reatividade contra antígenos da forma amastigota.

A imunização de camundongos com lisado de *Leishmania* induziu a produção de anticorpos específicos para a forma evolutiva utilizada no preparado imunogênico, enquanto que soros de camundongos infectados reagiram com ambos estágios parasitários. Esplenócitos de camundongos imunizados com lisado de amastigota, ou infectados com promastigotas, foram utilizados com sucesso na produção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra a forma amastigota.

Comparando-se os resultados obtidos com as três espécies de animais, conclui-se que a imunização através da infecção com promastigotas vivos é mais eficiente na indução da produção de anticorpos contra ambos os estágios de vida da *Leishmania*. Além disso, este protocolo de imunização não induz doença aparente nos animais e elimina a necessidade de procedimentos laboriosos de purificação de amastigotas de tecidos infectados para preparo dos lisados imunogênicos.



## Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-*Leishmania chagasi* amastigote antibodies of different animal species

Adriana M. Fróes<sup>a</sup>, Cláudia V.D. dos Santos<sup>a</sup>, Manoel L. Penha-Filho<sup>b</sup>,  
Márcia C.A. Teixeira<sup>b,c,d</sup>, Tânia Maria Correa Silva<sup>b,d</sup>,  
Geraldo G. Oliveira<sup>b</sup>, Washington L.C. dos Santos<sup>b,d</sup>,  
Lain C. Pontes-de-Carvalho<sup>b,d</sup>, Neuza M. Alcântara-Neves<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, Camela, 40.110-100 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, No. 121, 40.295-001 Salvador, Bahia, Brazil

<sup>c</sup>Faculdade de Tecnologia e Ciências (FTC), Av. Paralela 8812, Pituçu 41820-785, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>d</sup>Fundação para Desenvolvimento da Ciência, AV Dom João VI, 275 Brotas, 40290000 Salvador, Bahia, Brazil

Received 9 June 2003; received in revised form 1 December 2003; accepted 15 January 2004

### Abstract

This work aims at identifying an effective protocol to raise anti-*Leishmania chagasi* amastigote antibodies in different animal species. Protocols of immunization by subcutaneous injections of *L. chagasi* promastigote and amastigote lysates or by either intravenous or subcutaneous inoculation of live metacyclic promastigotes were assessed in mice, rabbits, and dogs. The immunization with live promastigotes produced a strong humoral immune response against *L. chagasi* amastigotes in all three animal species. The sera from animals immunized with the promastigote lysate did not react with amastigotes and, conversely, the sera from mice immunized with the amastigote lysate did not react with promastigotes. Taken all data together, the immunization through infection with metacyclic promastigotes was considered the most satisfactory way to immunize animals for obtaining anti-amastigote and anti-promastigote antibodies, since it did not only allowed the obtention of antibody against the two forms of the parasite, but it is also cheap, less laborious than carrying out the purification of amastigotes from infected tissues and avoid the use of a large number of hamsters for obtention the amastigotes, necessary to produce the immunogenic lysates. Furthermore, this immunization protocol was comparable to the amastigote lysate immunization protocol for the obtaining of mouse monoclonal antibodies (mAbs).

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Immune response; *Leishmania chagasi*-amastigotes; Antibodies-monoclonal; Immunohistology

**Abbreviations:** AVL, American visceral leishmaniasis; IFA, incomplete Freund's adjuvant; mAbs, monoclonal antibodies

\* Corresponding author. Tel.: +55-71-2458602/44;

fax: +55-71-2458917.

E-mail address: [neuza@ufba.br](mailto:neuza@ufba.br) (N.M. Alcântara-Neves).

### 1. Introduction

American visceral leishmaniasis (AVL), a chronic parasitic disease caused by *Leishmania chagasi* in the

New World, constitutes a serious public health problem in Brazil. It is characterized by intense macrophage parasitism by the *Leishmania* amastigote form, which is responsible for the pathogenesis of the disease (Chakrabarty et al., 1996; Lucena et al., 1996; Alexander et al., 1999). Many immunoparasitological studies on this disease require anti-*Leishmania* antibodies, which are generally produced through the immunization of animals with promastigote lysates. The promastigote, which is the vector stage of the parasite, is easily obtained from liquid cultures (Hendricks et al., 1978; Jaffe et al., 1984a, b). However, it differs antigenically from the amastigote (Sadick and Raff, 1985; Brandonisio et al., 2000; Teixeira et al., 2002), the stage that is present in the mammal host from a few hours after the beginning till the end of the infection.

Animal immunization protocols leading to the production of high levels of polyclonal anti-amastigote antibodies or to activated *Leishmania*-specific B cells for hybridoma and monoclonal antibody production are highly desirable. These antibodies can be of use for parasite detection in clinical specimens, for antigen purification procedures by immunoprecipitation or immunochromatography and for the development of more specific and non-invasive immunodiagnostic techniques such as detection of parasite antigens in patient's sera (Ismail et al., 1997; Hassan et al., 1998; Mansour et al., 1998; Garcia et al., 2002). Several protocols for the immunization of mice with different types of antigens have been described, aiming at obtaining anti-*Leishmania* monoclonal antibodies (mAbs) (Jaffe et al., 1984a, b; Anthony et al., 1985; Magill et al., 1993; Dabés Guimarães et al., 1996; Afrin and Ali, 1998). However, no comparison among these different protocols is available.

In this work, protocols for the immunization of mice, rabbits, and dogs were tested for their possible elicitation of a strong humoral response against *L. chagasi* amastigotes. Differences in the intensities of antibody production against promastigote or amastigote forms of *L. chagasi*, following either immunization with killed parasites or the infection of animals were found. Spleen cells from the immunized mice could be used for the production of hybridomas secreting anti-amastigote monoclonal antibodies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasites and parasite lysates

*L. chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2 strain) metacyclic promastigotes were obtained by cultivation of promastigotes in Schneider's medium (Schneider's insect medium, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) until the stationary phase, at 23 °C. *L. chagasi* amastigotes were obtained from the spleens of hamsters infected with  $1 \times 10^8$  *L. chagasi* metacyclic promastigotes and purified by centrifugation on a Percoll solution gradient (Chang, 1980; Taylor and Williams, 1992). *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* amastigotes were obtained by in vitro axenization of promastigotes (Teixeira et al., 2002). Lysates of both promastigote and amastigote forms were obtained by sonication (five cycles of 30 s with intermediate cooling cycles of 1 min at 80% output; Branson sonifier 450 W, Branson Instruments, Danbury, CT). The lysates were assayed for protein contents by means of a reaction with fluorescamine and kept cryopreserved at -70 °C till use. The promastigotes derived from amastigotes obtained from hamster spleens cultures were not subjected to more than 10 in vitro culture passages.

### 2.2. Immunizations

Groups of 4 to 10 BALB/c mice were immunized by means of the following protocols: (a) three biweekly subcutaneous injections of amastigote lysates containing 200 µg of protein emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA); (b) three biweekly subcutaneous inoculations of metacyclic promastigote lysates containing 200 µg of protein emulsified in IFA; (c) infection by weekly intravenous injection with  $5 \times 10^7$  live *L. chagasi* metacyclic promastigotes, for seven consecutive weeks.

A group of four rabbits was immunized by means of the following protocol: (a) four biweekly injections by the subcutaneous route of  $1 \times 10^8$  amastigote lysate emulsified in IFA or (b) five biweekly intravenous injections of  $1 \times 10^8$  live *L. chagasi* metacyclic promastigotes.

Four dogs were initially immunized with two biweekly injections by the subcutaneous route, of

promastigote lysate ( $1 \times 10^8$  parasites/animal) emulsified in IFA. Four weeks later, the same animals were infected by one subcutaneous injection of  $1 \times 10^8$  live *L. chagasi* metacyclic promastigotes. Control groups of three dogs, three rabbits and five mice were injected only with saline at the same intervals.

The effectiveness of the immunization was tested by indirect ELISA as described below. Mice sera were tested, at the 8 day after the last booster and the best responders were selected for spleen cell-myeloma cell fusion. Rabbit sera were tested 14 days after last booster. The effectiveness of dog immunization with promastigote lysate was measured 14 days after the antigen booster and at 11 months after the inoculation of live promastigotes.

### 2.3. Clinical follow up of infected animals

After immunization with live metacyclic promastigote mice remained with sub-clinical infection for at least 2 months when the last cell fusion was carried out. No clinical signs of visceral leishmaniasis, such as loss of weight, cachexia, alopecia, onychogryphosis or any other disease signs were observed during the experiment period in mice, rabbits or dogs.

### 2.4. Indirect ELISA

Sera of all groups of animals were assayed by indirect ELISA, for the presence of antibodies against *L. chagasi* amastigotes and promastigotes, as previously described (Paranhos-Silva et al., 1998). Briefly, microtiter plates wells (Corning Laboratory Science Co., NY, USA) were coated by incubation with  $2 \mu\text{g}$  of *L. chagasi* amastigote or promastigote lysates in  $100 \mu\text{l}$  of  $0.1 \text{ M}$  carbonate buffer, pH 9.6, followed by successive incubations with: (a) blocking solution consisting of 10% skimmed milk; (b) four dilutions of each test sera in phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) containing 5% skimmed milk (W:V); (c) peroxidase-conjugated (Sigma Chemicals, St. Louis, USA) antibodies against mouse, rabbit or dog IgG and (d) the chromogenic substance *O*-phenylenediamine (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) and the substrate hydrogen peroxide. The reaction was read using a micro titer reader at 450 nm filter (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA, USA). Positive

and negative controls included in the plates were respectively, sera from *L. chagasi* experimentally infected or non-infected mice, rabbits, and dogs.

### 2.5. Hybridoma production and characterization of monoclonal antibodies

The best responders mice of groups immunized with amastigote lysate and infected with alive promastigotes were selected for cellular fusion. Three days after an intravenous booster with  $200 \mu\text{g}$  of amastigote lysate, the animals were sacrificed and their spleen cells submitted to fusion with SP2-0 myeloma cells, according to Jaffe et al. (1984a, b). The hybridomas obtained were screened for the production of anti-*Leishmania* antibodies, by testing the supernatants reactivity against *L. chagasi* amastigote antigens by ELISA. Their immunoglobulin sub-classes were determined by a capture ELISA using a commercially available kit (Pharmingen, Los Angeles, CA, USA), and their reactivities to *Leishmania* species and stages were determined by indirect ELISA as stated above, and by Western-blot, using as antigens amastigote and promastigote lysates of *L. chagasi*, *L. amazonensis*, and *L. braziliensis* and promastigote lysate of *Leishmania major*. For the Western blots,  $10^8$  promastigote and  $7 \times 10^8$  amastigote forms were resuspended in  $100 \mu\text{l}$  of SDS-sample buffer and boiled for 3 min (denatured) or not boiled (non-denatured). After microcentrifugation, the supernatants were loaded to 10% SDS-PAGE gels and subjected to Western-blot using the same reagents used for the indirect ELISA detailed above.

The capacity of the mAbs to recognize *L. chagasi* amastigotes in paraffin-embedded tissue was investigated by testing undiluted supernatants on *L. chagasi*-infected hamster liver sections, previously fixed with formaldehyde, embedded with paraffin, deparaffinized, and developed with the use of an anti-mouse immunoglobulin-peroxidase conjugate (Dako, Carpinteria, CA, USA), and a precipitating chromogenic substrate solution containing 3,3'-diamino benzidine (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and hydrogen peroxide (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), according to Livni et al. (1983). Sections incubated with normal mouse serum diluted 1:200 in saline were used as negative controls.



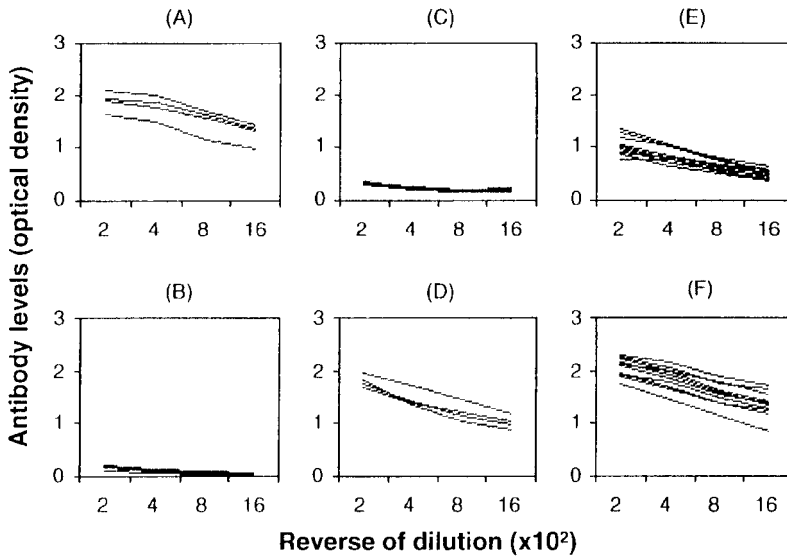


Fig. 1. Antibodies in the sera from mice immunized with three different protocols, detected by indirect ELISA, against *L. chagasi* amastigote (A, C, and E) and promastigote (B, D, and F) antigens. The mice were immunized with amastigote lysate (A and B), promastigote lysate (C and D) or were infected with live metacyclic promastigotes (E and F), as described in Section 2. Each line represents data obtained from the serum of an individual mouse, and graphs depict data from 4 to 10 animals.

### 3. Results

Sera from mice immunized with promastigote lysate reacted only with promastigote antigens, and sera from mice immunized with amastigote lysate reacted only with amastigote antigens in an ELISA. On the other hand, the sera of animals infected with live metacyclic promastigotes reacted with both parasite stages (Fig. 1). Similar results were obtained with the rabbit (Fig. 2) and dog immunizations (Fig. 3). Sera from the negative control animals reacted only at back-ground levels (OD less than 0.1) with the tested *Leishmania* antigens (not shown).

The fusion of splenocytes from mice immunized with the amastigote lysate with mieloma cells generated three hybrid clones producing anti-*L. chagasi* amastigote IgG1 antibodies; the fusion carried out with splenocytes from mice infected with live metacyclic promastigotes generated seven clones, six producing IgG2a, and one IgM mAbs (data not shown).

Four of those mAbs were tested by ELISA against four *Leishmania* species. The IgG2a mAbs reacted only with *L. chagasi* amastigotes, while the IgM mAb reacted with *L. chagasi*, *L. braziliensis*, and *L.*

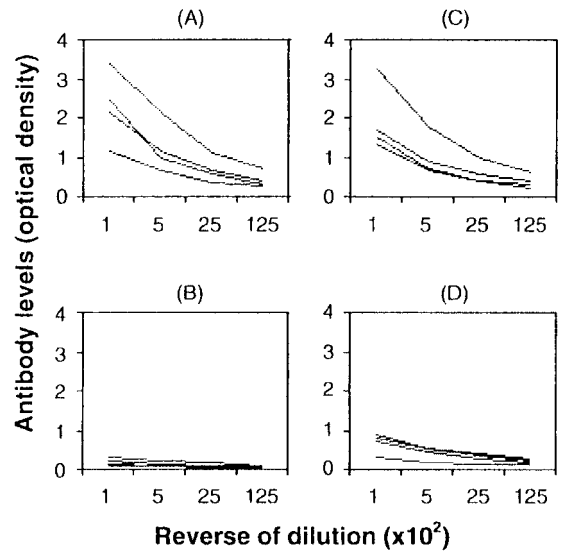


Fig. 2. Antibodies in the sera from rabbits immunized with two different protocols, detected by indirect ELISA, against *L. chagasi* amastigote (A and C) and promastigote (B and D) antigens. The rabbits were immunized with amastigote lysate (A and B) or infected with live metacyclic promastigotes (C and D), as described in Section 2. Each line represents data obtained from the serum of an individual rabbit, and graphs depict data from four animals.

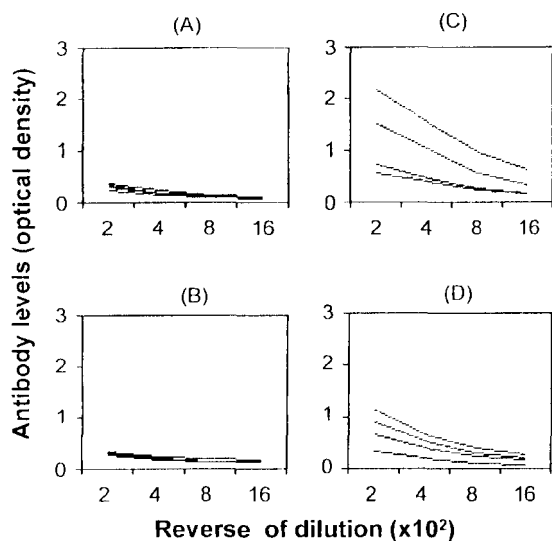


Fig. 3. Antibodies in the sera from dogs immunized with two different protocols, detected by indirect ELISA, against *L. chagasi* amastigote (A and C) and promastigote (B and D) antigens. Dogs were immunized with promastigote lysate (A and B) or immunized with promastigote lysate and infected with live metacyclic promastigotes (C and D), as described in Section 2. Each line represents data obtained from the serum of an individual dog, and graphs depict data from four animals.

*amazonensis* amastigotes and promastigotes with *L. major* promastigotes (Fig. 4A1 and A2).

The seven mAbs obtained from mice infected with live metacyclic promastigotes, were used in a Western-blot for determination of the apparent molecular weights of the recognized *L. chagasi* amastigote antigens. The six IgG2a mAbs recognized two non-denatured *L. chagasi* amastigote proteins, with 35 and 68 kDa. The IgM mAb reacted with a denatured and non-denatured 60 kDa protein (Fig. 4B1 and B2).

One of the IgG2A mAbs successfully stained *L. chagasi* amastigotes in paraffin-embedded *L. chagasi*-infected hamster liver sections fixed with formaldehyde (Fig. 4C).

#### 4. Discussion

The immunization of mice with *Leishmania* lysates elicited the production of stage-specific antibodies, i.e., sera from mice immunized with promastigote lysate did not react with amastigote antigens, and sera

from mice immunized with amastigote lysate did not react with promastigote antigens, putting in evidence the antigenic differences between the two leishmanial forms. On the other hand, the sera of animals immunized with live metacyclic promastigotes reacted with both parasite stages.

The protocols of mouse immunization with amastigote lysate and of mouse infection with live metacyclic promastigotes were effective in terms of allowing the production of anti-amastigote antibody-secreting mouse hybridomas.

From the three immunization protocols tested in this work, two, the immunization with amastigote lysate and the infection with live promastigotes were indeed capable of evoking a strong response against *L. chagasi*. The infection with live metacyclic promastigotes, is of easy execution, since it just requests the cultivation of promastigote forms of the parasite, which is readily performed and reproducible, while the immunization protocol using amastigote antigens demands the infection and culling of several infected hamsters for obtaining the parasite, procedures that are not ethically justifiable if they can be avoided. In addition, the techniques for obtaining purified amastigotes from infected animal tissues are highly laborious, time consuming, dependent on technical skill and subjected to variations in terms of degree of contamination by the host tissue debris.

A disadvantage, in terms of ethical considerations, of infecting mice, dogs or rabbits with *L. chagasi* promastigotes for immunization purpose, could be considered. However, mice and dogs are relatively resistant to experimental *L. chagasi* infection, despite the detection of amastigotes in their internal organs (Oliveira et al., 1993; Streit et al., 2001) and rabbits seem to be completely refractory to the infection (Rassam et al., 1984). In fact, all infected animals in the experiment described herein had no clinical signs of the disease throughout the experimental period.

In view of the several advantages stated above, the animal immunizations with live metacyclic promastigotes of *L. chagasi* presented in this work was considered the most practical way for obtaining a strong humoral answer against amastigotes forms of this parasite, with high sera levels of anti-amastigote antibodies in the three tested animal species. The immunization with live promastigote and amastigote lysates were comparable in terms of allowing the obtaining of

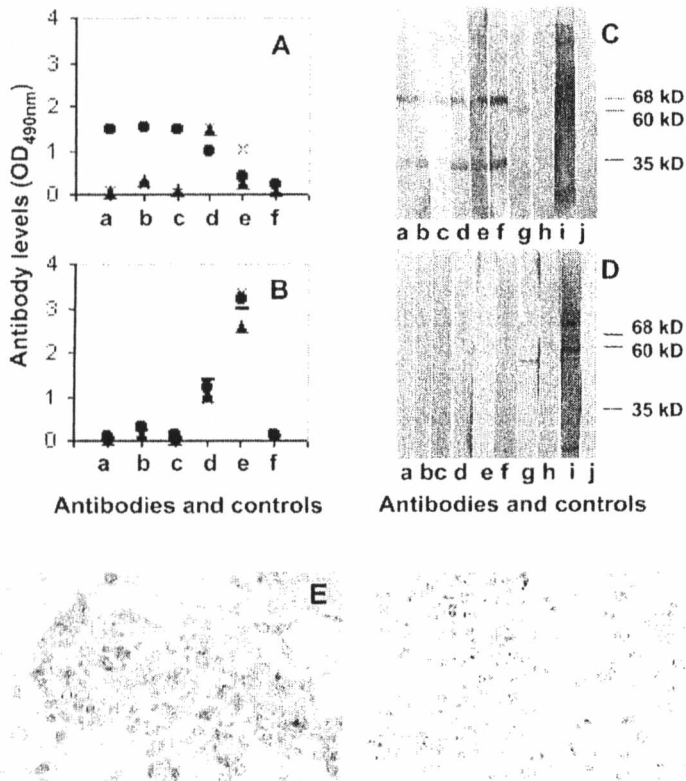


Fig. 4. Characterization of the obtained monoclonal antibodies. Four different monoclonal antibodies were tested against amastigote (A) and promastigote (B) lysates, of different *Leishmania* species, in an indirect ELISA. Symbols in A, B, C, and D correspond to results obtained with three IgG2a mAbs, and to results obtained with an IgM mAb, in E, with a *Leishmania chagasi* infected mouse serum dilution and in f with a non-infected mouse serum dilution. (●), *L. chagasi* lysate; (▲), *L. braziliensis* lysate; (×), *L. amazonensis* lysate; (-), *L. major* lysate. The antigens recognized by seven mAbs (lanes a–g) were identified by Western blots, using non-denatured (C) and denatured (D) *L. chagasi* amastigote lysates. Lane h correspond to a saline control; lane i to a *L. chagasi* infected mouse serum dilution and lane j to an irrelevant mAb. The positions of molecular weight markers are shown in the right of the figures. Amastigotes were detected in a *L. chagasi* infected-hamster liver section by immunohistochemistry using an IgG2a mAb as the first antibody, as detailed in Section 2 (E). Note the absence of stained structures in a section incubated with a normal mouse serum dilution instead of the mAb (F).

anti-amastigote mAb-producing hybridoma. Furthermore, both immunization generated antibody useful for immunohistochemical assays. Although not shown in this paper, the immunization with live promastigote induced a positive *in vitro* lymphoproliferative response to *L. chagasi*, which could be used as a positive control response on phase I vaccine efficiency studies (Teixeira et al., unpublished data).

## 5. Conclusion

Taken all data together, the immunization with live metacyclic promastigotes was considered the most

satisfactory way to immunize animals for obtaining anti-amastigote antibodies. This immunization protocol was also comparable to the amastigote lysate immunization protocol for the obtaining of mouse monoclonal antibodies.

## Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) and by the UFBA/CADCT PRO-DOC Programme. We are grateful to UFBA/PIBIC, Fundação Oswaldo Cruz and CAPES for providing scholarships

for respectively Fróes AM, Teixeira MCA, Penha Filho ML, and dos Santos CVD.

## References

- Afrin, F., Ali, N., 1998. Isotype profiles of *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: preferential stimulation of IgG2a/b by liposome-associated promastigote antigens. *J. Parasitol.* 84, 743–748.
- Alexander, J., Satoskar, A.R., Russell, D.G., 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.* 112 (18), 2993–3002.
- Anthony, R.L., Williams, K.M., Sacci, J.B., Rubin, D.C., 1985. Subcellular and taxonomic specificity of monoclonal antibodies to New World *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 1085–1094.
- Brandonisio, O., Panaro, M.A., Sisto, M., Acqnafredda, A., Fumarola, L., Leogrande, D., 2000. Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia* 42 (3–4), 183–190.
- Chakrabarty, R., Mukherjee, S., Lu, H.G., McGwire, B.S., Chang, K.P., Basu, M.K., 1996. Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG). *J. Parasitol.* 82, 632–635.
- Chang, K.P., 1980. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science* 12, 1240–1242.
- Dabês Guimarães, T.M., de Toledo, V.D., da Costa, C.A., da Costa, R.T., Genaro, O., Williams, P., Mayrink, W., 1996. Assessment of immunity induced in mice by glycoproteins derived from different strains and species of *Leishmania*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 63–70.
- García, H.H., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Bernal, F., Rodriguez, S., Pretell, E.J., Azeurra, O., Parkhouse, R.M., Tsang, V.C., Harrison, L.J., 2002. The Cysticercosis working group in Peru. Circulating parasite antigen in patients with hydrocephalus secondary to neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66 (4), 427–430.
- Hassan, M.M., Medhat, A., Makhlof, M.M., Shata, T., Nafeh, M.A., Osman, O.A., Deaf, E.A., Galal, N., Foad, Y.M., 1998. Detection of circulating antigens in patients with active *Schistosoma haematobium* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59 (2), 295–301.
- Hendricks, L.D., Wood, D.E., Hajduk, M.E., 1978. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. *Parasitology* 76, 309–316.
- Ismail, A., Kharazmi, A., Permin, H., el Hassan, M., 1997. Detection and characterization of *Leishmania* in tissues of patients with post kala-azar dermal leishmaniasis using a specific monoclonal antibody. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91, 283–285.
- Jaffe, C., Bennett, E., Grimaldi Junior, G., McMahon-Pratt, D., 1984a. Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosis. *J. Immunol.* 133, 440–447.
- Jaffe, C., Grimaldi, G., McMahon-Pratt, D., 1984b. The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: Morel C.M. (Ed.), *Genes and Antigens of Parasites*. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Livni, N., Abramowitz, A., Londner, M., Okon, E., Morag, A., 1983. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]* 401, 147–151.
- Lucena, R., Ginel, P.J., Lopez, R., Novales, M., Martín, E., Molleda, J., 1996. Antinuclear antibodies in dogs with Leishmaniasis. *J. Vet. Med. Ass.* 43, 255–259.
- Magill, A.J., Grögl, M., Gasser Junior, R.A., Sun, W., Oster, C.N., 1993. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm. *N. Engl. J. Med.* 328, 1383–1387.
- Mansour, W.A., Kaddah, M.A., Shaker, Z.A., Al Assal, F.M., Derbala, M.F., 1998. A monoclonal antibody diagnoses active *Fasciola* infection in humans. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 28 (3), 711–727.
- Oliveira, G.G., Santoro, F., Sadigursky, M., 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88, 243–248.
- Paranhos-Silva, M., Nascimento, E.G., McIro, M.C., Oliveira, G.G., dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L.C., Oliveiras-Santos, A.J., 1998. Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop.* 69, 75–83.
- Rassam, M.B., Al-Nuaimi, M.S., Issa, F.S., 1984. Affinity separation and partial characterization of serologically active *Leishmania donovani* antigens. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78, 35–41.
- Sadick, M.D., Raff, H.V., 1985. *Leishmania tropica*: differences in the antigenicity of promastigotes and amastigotes. *Cell Immunol.* 91 (2), 404–414.
- Sireit, J.A., Recker, T.J., Filho, F.G., Beverley, S.M., Wilson, M.E., 2001. Protective immunity against the protozoan *Leishmania chagasi* is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms. *J. Immunol.* 166, 1921–1929.
- Taylor, D.R., Williams, G.T., 1992. Differentiation and limited proliferation of isolated *Leishmania mexicana* amastigotes at 27 °C. *Acta Trop.* 50, 141–150.
- Teixeira, M.C., de Jesus Santos, R., Sampaio, R.B., Pontes-de-Carvalho, L., dos-Santos, W.L., 2002. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol. Res.* 88 (11), 963–968.

### 4.3 ARTIGO III: A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries.

#### JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO:

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral é complicado devido às semelhanças com outras doenças causadoras de esplenomegalia febril. Além disso, a confirmação da suspeita clínica através do isolamento do parasito em aspirados de medula óssea, baço e linfonodos é dificultada pela baixa sensibilidade dos métodos utilizados e da necessidade de procedimentos invasivos. Desta forma, na maioria das vezes, o diagnóstico da leishmaniose visceral baseia-se exclusivamente nos achados clínicos e na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes. Entretanto, os métodos tradicionais que utilizam lisados parasitários como fonte de antígenos podem apresentar reatividade cruzada, principalmente com outras espécies de parasitos da família Trypanosomatidae (KAR, 1995), tornando relevante a obtenção de antígenos específicos para uso no sorodiagnóstico da LV.

Estudos da resposta imune humoral contra antígenos de *Leishmania* utilizando Western blot têm demonstrado um perfil de reconhecimento bastante variável tanto por soros humanos (MARY, 1992) quanto por soros de cães (ROLLAND, 1994; AISA, 1998). De fato, soros de cães de área endêmica, com diagnóstico parasitológico confirmado, foram capazes de reconhecer de três até 33 frações polipeptídicas de antígenos de *L. infantum*, com pesos moleculares variando entre 12 e 85 kDa (AISA, 1998). A variabilidade da resposta humoral, mesmo em animais da mesma espécie, pode ser devido a diferenças genéticas entre indivíduos, à história de infecções/patologias prévias (que poderiam modular a resposta imune subsequente à infecção por *Leishmania*) ou à maneira estocástica que o linfócito encontra o antígeno durante a resposta imune, torna-se ativado e modula a ativação de outros linfócitos com diferentes especificidades. Desta forma, o ideal seria utilizar um grupo pequeno, porém molecularmente bem definido, de antígenos para o desenvolvimento de testes sorológicos mais sensíveis e específicos. Visando este objetivo, produzimos em colaboração com Dr. Daniel Eichinger, pesquisador do New York University Medical Center, uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. infantum/chagasi*, utilizando como vetor o bacteriófago lambda (ZAP Express Vector,

Stratagene). Apesar da *L. braziliensis* ser considerada mais imunogênica que a *L. infantum*, esta última foi escolhida para produção dos antígenos por apresentar em ensaios de linfoproliferação e testes de resposta celular cutânea uma melhor reatividade em 5 cães infectados naturalmente com esta espécie (dados não publicados). Os amastigotas utilizados para purificação do RNA foram provenientes de baço de hamsters infectados, uma vez que os amastigotas axênicos de *L. infantum/chagasi*, embora morfológicamente semelhantes às formas intracelulares, não apresentaram homogeneidade quanto à viabilidade e infectividade (contrastando com o observado com as outras espécies de *Leishmania* testadas; Artigo I).

Para a triagem inicial dos antígenos da biblioteca, foi utilizada uma mistura de três soros de cães infectados naturalmente com perfil de resistência à LV (animais assintomáticos com teste intradérmico positivo a antígenos de *Leishmania*) ou uma mistura de cinco soros de pacientes com LV e sorologia positiva para anticorpos anti-*Leishmania*. Esta seleção prévia forneceu cinco antígenos totalmente diferentes entre si, de acordo com o sequenciamento parcial dos insertos. Destes, quatro antígenos foram testados em um ensaio de “dip stick” com soros humanos, visando o desenvolvimento de um conjunto (KIT) para imunodiagnóstico da LV.

## RESULTADOS:

Soros de 22 pacientes com LV confirmada por diagnóstico parasitológico foram testados em ensaio de “dip stick” contra os quatro antígenos recombinantes. Vinte soros reconheceram pelo menos um dos antígenos recombinantes e dois soros, apesar de reagirem no Western blot com lisado total de *Leishmania*, não reconheceram nenhum dos quatro antígenos. A mistura desses dois soros foi utilizada para uma nova seleção de proteínas recombinantes da biblioteca, levando à identificação de um quinto clone. Em seguida foram testados mais 32 soros frente ao novo painel composto pelos cinco antígenos recombinantes, apresentando uma elevação da sensibilidade do ensaio de 83,3% para 92,6% em relação ao total de 54 soros testados. Soros provenientes de indivíduos normais (n=22) ou de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (n=4), hanseníase (n=5) ou doença de Chagas (n=1) não reagiram com o painel de antígenos. Do total de 54 soros de pacientes

com LV testados, quatro permaneceram não reativos, sendo que três foram utilizados para nova busca de antígenos na biblioteca de cDNA, reconhecendo mais clones expressando proteínas de *L. infantum*.

A metodologia de seleção de proteínas recombinantes em bibliotecas gênicas, utilizando soros falso-negativos desenvolvida neste trabalho, é extremamente simples e proporciona uma obtenção de antígenos direcionada para aqueles que podem aumentar a sensibilidade de métodos sorodiagnósticos. A utilização dos antígenos recombinantes selecionados neste trabalho para o desenvolvimento de um ensaio “dip stick”, e a determinação da sensibilidade e especificidade do teste, foram objetos da tese de mestrado de Marco Antônio Silvany (SILVANY, 2002).

\* Aceito para publicação no periódico estrangeiro: *Biologicals*, novembro de 2005.

## A strategy for identifying serodiagnostically relevant antigens of *Leishmania* or other pathogens in genetic libraries

Márcia C.A. Teixeira<sup>a,b</sup>, Geraldo G.S. Oliveira<sup>a</sup>, Marco A. Silvany<sup>a,b</sup>, Neuza M. Alcântara-Neves<sup>a,c</sup>, Milena B.P. Soares<sup>a</sup>, Ricardo Ribeiro-dos-Santos<sup>a</sup>, Selma M.B. Jerônimo<sup>d</sup>, Carlos H. Costa<sup>c</sup>, Aldina P. Barral<sup>a</sup>, Washington L.C. dos-Santos<sup>a</sup>, Daniel Eichinger<sup>f</sup> and Lain Pontes-de-Carvalho<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Valdemar Falcão 121, 40295-001, Salvador, Brazil*

<sup>b</sup>*Faculdade de Tecnologia e Ciências - FTC, Salvador, Brazil*

<sup>c</sup>*Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil*

<sup>d</sup>*Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil*

<sup>e</sup>*Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brazil*

<sup>f</sup>*New York University Medical Center, New York, NY, USA*

Running title: Identification of antigens in genetic libraries

\*Corresponding author: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Valdemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, Brasil. Tel: +55 71 3560129. Fax: +55 71 3562155. E-mail: lain@cpqgm.fiocruz.br



## Abstract

Different individuals, when infected with the same parasite, rarely produce antibodies against the same set of antigens. Indeed, unless a particular antigen happens to be recognized by antibodies in all individuals, the use of a single antigen in the serodiagnosis of parasitic diseases leads, invariably, to false-negative results. A straightforward method for pin-pointing, in genetic libraries, the precise antigens that would increase serodiagnostic assay sensitivities is presented. The method is based on the utilization of sera that produced false-negative results against previously available antigens. Employing this false-negative serum selection methodology for the identification of new *Leishmania infantum* recombinant antigens (rAgs), the sensitivity of a dipstick assay for anti-*Leishmania* antibodies in a panel of sera from patients with visceral leishmaniasis was increased from 83.3% to 98.1%, without affecting its specificity, by the inclusion of a fifth and a sixth *Leishmania chagasi* rAg.

*Keywords:* Recombinant antigen, cDNA library, serodiagnosis, immunoassay sensitivity, *Leishmania infantum*, visceral leishmaniasis.

## Introduction

Obtaining several milligrams of a pure protein from a complex microorganism was not an easy task a few years ago. The recombinant DNA technology, however, is changing this situation: many homogeneously pure microbial antigens can now be obtained in large amounts with relative ease. Serodiagnostic assays of several infectious diseases, therefore, increasingly employ recombinant [1-4] rather than native antigens. A major obstacle, however, limits the use of a single antigen in the serodiagnosis: the specificities of the immune responses against complex microorganisms vary in different individuals, and, to the authors' best knowledge, no single antigen is recognized by antibodies in all of them. For instance, even when relatively few sera from *Leishmania infantum*- (n=9) or *Trypanosoma cruzi*-infected (n=8) human beings, or from rabbits immunized with a mixture of keyhole limpet hemocyanin and *Mycobacterium tuberculosis* antigens in mineral oil-saline emulsion (n=7), were analysed by Western blot against *L. infantum*, *T. cruzi* or cross-reactive *Trypanosoma brucei* lysates, respectively, no single antigenic band was clearly recognized by all tested sera (Fig. 1; unpublished data). The solution for this problem, however, may be the employment of more than one antigen in a serodiagnostic assay: this would maximize the chances of detecting antibodies in all positive sera.

To improve a serodiagnostic recombinant antigen (rAg) panel, it would be desirable to pin-point, in genetic libraries, precisely the phages encoding the rAGs that might increase the assay sensitivity, ignoring those phages encoding already available antigens. This may be a difficult task - the best represented (not necessarily the most immunogenic, i.e, serodiagnosis-relevant) antigens in a library, after been easily picked up, leave behind a high "background" of undesirable phages encoding them. This would obstruct the identification of the relative small number of phages encoding the desired new antigens. A direct way for obtaining these relatively rare rAGs is to use, as a screening tool, exactly the sera previously producing false-negative results: these sera do not, by definition, recognize the already available antigens. This false-negative serum-selection strategy was employed as described below, in two quick runs, to identify two different *L. infantum* rAGs from a cDNA library. These rAGs, due to the very process of their obtaining, are recognized by previously false-negative sera, and are

therefore promising candidates to increase the sensitivity of a serodiagnostic assay for zoonotic visceral leishmaniasis (VL), a Latin American / Southern European disease caused by the *L. infantum* protozoan [5-6].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sera

Serum samples from 54 VL patients, inhabiting an endemic area of the state of Rio Grande do Norte, in the dry, poor northeastern region of Brazil, were used. All patients had diagnoses confirmed by demonstration of the parasite in bone marrow aspirates. Control sera were from 22 informed healthy volunteers without history of leishmaniasis. All sera were prepared from blood collected for immunodiagnostic purposes and for the development of serodiagnostic assays, in accordance with institutional ethical guidelines (which include patients' informed consent).

### 2.2. Recombinant antigens and antigen-coating of nitrocellulose paper

Nitrocellulose paper was individually coated, as described below, with: (i) *Leishmania* rAgs in *Escherichia coli* lysates; (ii) negative control *E. coli* lysate; and (iii) positive control *Leishmania* lysate.

*L. infantum* amastigotes were obtained from the spleens of hamsters infected with  $10^8$  metacyclic promastigotes and purified by centrifugation on a Percoll solution gradient [7]. The RNA isolated from purified amastigotes was used to construct a cDNA library in lambda ZAP bacteriophage (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in accordance with manufacturer's instructions, in one of our laboratories. The library was screened with antibodies from pools of sera from (a) three dogs or (b) five human beings, all from VL endemic areas and with *Leishmania* amastigotes isolated from spleen or bone-marrow aspirates. Canine blood was collected by a veterinarian, in accordance with institutional ethical guidelines. Bacteriophages were isolated from the antibody-reacting plaques and incubated with *Escherichia coli* agar cultures in Petri dishes, in the presence of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG), for the expression of the encoded recombinant proteins. The amount of added bacteriophages was that previously determined, by titration, to cause confluent lytic plaques on the bacterium layer after a 16-hour

incubation period at 37° C. After a 3-hour incubation of the bacteriophage-bacterium mixture, nitrocellulose paper disks were juxtaposed onto the agar surface and incubated for 16 hours at 37° C, in order to become coated with the expressed recombinant proteins. As negative control of solid phase-antigen, nitrocellulose disks were coated with non-specific protein lysates from agar plates in which *E. coli* was infected with, non-recombinant lambda ZAP bacteriophages. *L. infantum* promastigotes, obtained from stationary-phase cultures in Schneider's insect cell medium containing 10% foetal bovine serum [8], were lysed by sonication at 4° C (as a source of crude *Leishmania* antigen) and used to coat nitrocellulose paper at a concentration of 20 µg.ml<sup>-1</sup> of 0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS), during a 16-hour incubation at 4° C. Possibly remaining protein-binding sites on recombinant and control antigen-coated nitrocellulose papers were blocked by incubation with 5% (w/v) dry skimmed milk in PBS for at least one hour at room temperature. Small (8 x 2 mm) rectangular pieces were cut from the different antigen-coated nitrocellulose papers and transversally glued onto the same rigid plastic strip (8 x 700 mm dipstick), so as to form an array of several solid-phase antigens, disposed side by side, to be simultaneously tested in the dipstick assay. Selected phages were converted to plasmids by excision protocol (Stratagene) and had their inserted cDNA sequenced. Four different rAgs were used initially in the dipstick assay.

### 2.3. Dipstick, ELISA and Western blot assays

Sera were tested against the individual recombinant antigens by their incubation with the array of antigen-coated rectangular nitrocellulose paper pieces described above. Briefly, the antigen array was incubated with 1:400 dilutions of VL patients' or control sera. The binding of antibodies to the antigens was revealed by successive incubations with an anti-human IgG Fc – peroxidase conjugate (IgG-specific) and with a mixture of hydrogen peroxide and the diaminobenzidine chromogen (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), as described elsewhere [9]. Western blots and ELISA were carried out with *L. infantum* lysates, as described previously [10-11]. A serum staining any of the rAg-coated pieces of paper in the array was considered as producing a positive reaction.

### 3. Results and discussion

Twenty-two VL patients' sera were initially tested in a dipstick assay using nitrocellulose strips carrying four spots individually coated with the four rAgs that were obtained as described above (4-rAg dipstick assay). Two of these sera, however, despite reacting with the *Leishmania* lysate, did not react with any rAg (Fig. 2a). A pool of the two sera producing false-negative results in this 4-rAg assay was used to re-screen the cDNA library, leading to the identification of a fifth rAg. This was used to set up a 5-rAg assay, which, in its turn, when tested against 32 previously untested VL patients' sera, led to the identification of four false-negative sera. A pool of three of these new false-negative sera was then used for a third screening of the cDNA library, identifying a sixth antigen, which was also added to the dipstick assay. The reactivities of all 54 VL patients' and 22 control sera were finally assessed against each of the six rAgs in this last dipstick assay. Nine of the 54 (16.7%) tested VL patients' sera did not react with any of the original four rAgs (Fig. 2b). A fifth rAg, obtained by means of screening a *L. infantum* cDNA library by a pool of two sera that did not recognize any of the four rAgs, was recognized by five of these nine initially false-negative sera (including the two sera used in its selection). An immunoassay utilizing the five rAgs, therefore produced only four (7.4 %) false-negative results when tested against the 54 sera. A sixth rAg, obtained with the use of a pool of three of these four remaining false-negative sera, were used to set up a 6-rAg dipstick assay, which produced only one false-negative result (1.9%) when tested against the 54 sera (Fig. 2b). This remaining false-negative serum did not react with *L. infantum* native antigens, either in an ELISA, a Western blot or in the dipstick assay.

Although, as mentioned above, only one (1.9%) of the 54 sera failed to recognize at least one of the six rAgs, each of these rAgs, when isolatedly analysed, were not recognized by 12 (22.2%) to 37 (68.5%) of the 54 sera. In addition, no rAg shared with another the reactivity against the same set of sera, demonstrating that the six rAgs differed antigenically among themselves. None of the 22 control sera reacted with any of the six rAgs in the dipstick assay (not shown).

The false-negative serum-selection methodology has been employed, in two runs, as described herein, to expand a panel of *L. infantum* rAgs from four to six

antigens, increasing from 83.3 to 98.1 the percentage of 54 VL patient's sera that reacted with at least one of the antigens in a dipstick assay. These six rAgs were not recognized by antibodies from 22 healthy individuals' sera in the dipstick assay, indicating that they are promising candidates for being included in serodiagnostic assays. The rAgs used in the work described herein should be tested against large numbers of sera from patients with LV, other clinical forms of leishmaniasis and other infectious and non-infectious diseases, and from healthy individuals, in order to allow the determination of the specificity and sensitivity of immunoassays employing them.

The sensitivity of a serological assay would of course reach 100% only if all infected or sick individuals made antibodies, something that would hardly happen in the first few days after an infection or in some immunodeficient individuals. In fact, antibodies against crude *L. infantum* antigens were not detected in one of the 54 studied VL patients' sera, making it unattainable, whichever assay were used, to obtain an 100% positive record with this particular set of 54 sera.

The exposure of isolated rAgs in individual spots on the solid phase (rather than using an antigenic mixture), as performed in the work described herein, may have the effect of increasing the assay specificity, since it would allow the visualization of antibody reactions against individual rAgs. This might disclose possible infection- or disease-specific reaction patterns (as happens, for instance, for Western blots in HIV infection). The isolated application of rAgs to the solid phase has the additional advantage of increasing the density of each antigen. In the alternative case of utilizing an antigenic mixture, if any of the antigens in the mixture is poorly recognized by antibodies in a particular serum, it will "dilute out" the remaining antigens in the solid phase. This, complying with the association affinity constant equation [12], would obligatorily decrease the binding of antibodies to the solid phase and reduce the assay sensitivity.

Despite the simplicity and potential usefulness of the false-negative serum-selection method described herein, saving both assay developer's time and expensive reagents, to the authors' best knowledge it has not been reported previously, and it may therefore have been unduly neglected as a quick process to pick up serodiagnostically relevant antigens in genetic libraries.

## Acknowledgments

This work was financially supported by the Brazilian Ministry of Science and Technology (PRONEX, PADCT and CNPq) and the State Government of Bahia, Brazil (CADCT/FAPESEB); D.E. was supported by US NIH grant AI44893. We thank Ms. Fabíola Nascimento for reviewing the English language of this manuscript.

## References

- [1] Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:3303-10.
- [2] Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 2001;17:286-91.
- [3] Jiang J, Marienau KJ, May LA, Beecham HJ 3rd, Wilkinson R, Ching WM, Richards AL. Laboratory diagnosis of two scrub typhus outbreaks at Camp Fuji, Japan in 2000 and 2001 by enzyme-linked immunosorbent assay, rapid flow assay, and Western blot assay using outer membrane 56-kD recombinant proteins. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:60-6.
- [4] Suh IB, Choi HK, Lee SW, Woo SK, Kang HY, Won YD, Cho M, Lim CS. Reactivity of sera from cases of *Plasmodium vivax* malaria towards three recombinant antigens based on the surface proteins of the parasite. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97:481-7.
- [5] Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983;77:569-96.
- [6] Fenech FF. Leishmaniasis in Malta and the Mediterranean basin. *Ann Trop Med Parasitol* 1997;91:747-53.
- [7] Chang KP. Human cutaneous leishmaniasis in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science* 1980;209:1240-42.

- [8] Eperon S, McMahon-Pratt D. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *L. braziliensis*. *J Protozool* 1989;36:502-10.
- [9] Chu NM, Janckila AJ, Wallace JH, Yam LT. Assessment of a method for immunochemical detection of antigen on nitrocellulose membranes. *J Histochem Cytochem* 1989;37:257-63.
- [10] Schenkman S, Pontes de Carvalho LC, Nussenzweig V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J Exp Med* 1992;175:567-75.
- [11] Paranhos-Silva M, Freitas LAR, Dos Santos WLC, Grimaldi Jr G, Pontes de Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos AJ. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55:39-44.
- [12] Roitt IM, Delves PJ. *Essential Immunology*, 10th edn. Blackwell Science Ltd., Oxford, 2001.

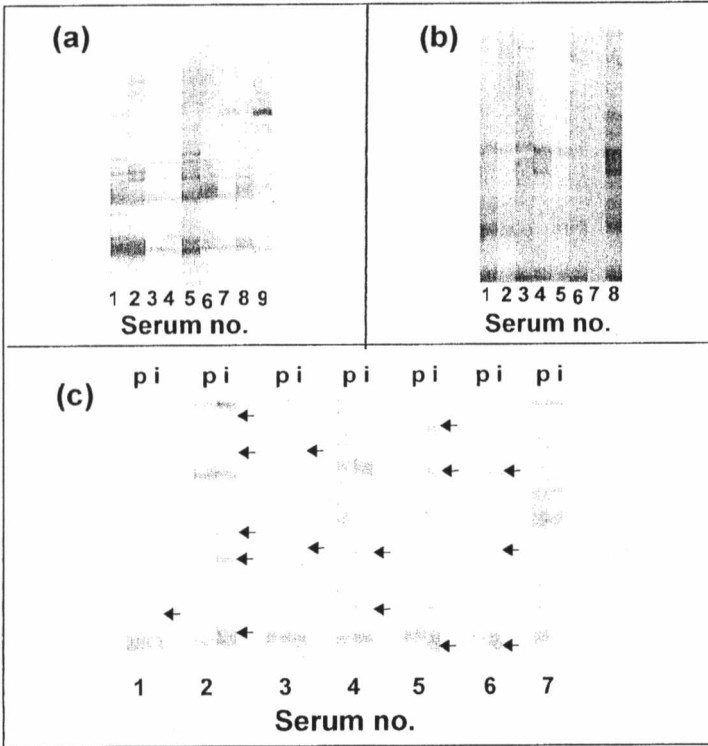


## Legends to figures

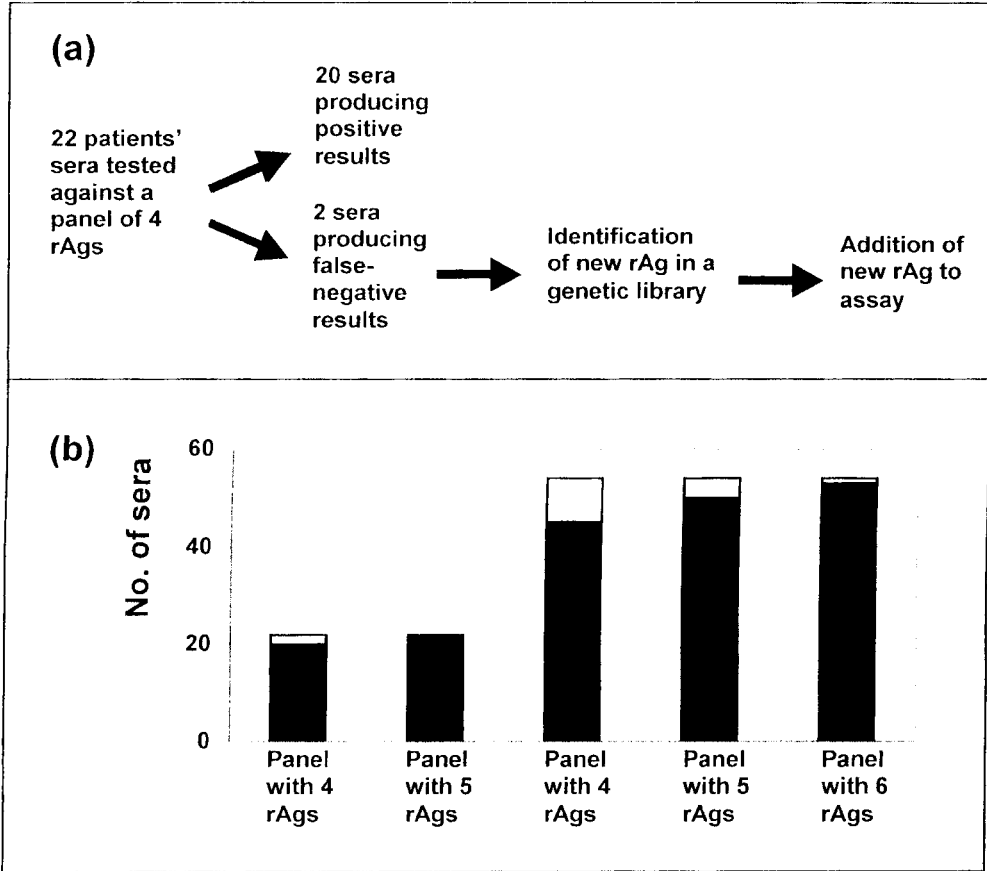
**Fig. 1.** Variability of immune responses in parasite-infected human beings or in animals immunized with complex antigenic mixtures. Sera from human beings naturally infected by *Leishmania chagasi* (**a**) or by *Trypanosoma cruzi* (**b**), and from New Zealand rabbits before and after immunization with a mixture of *Mycobacterium tuberculosis* and keyhole limpet hemocyanin (**c**), were used in Western blot assays against *L. chagasi*, *T. cruzi* and *Trypanosoma brucei* lysates, respectively. Each column corresponds to the reaction pattern of an individual serum. Arrows indicate antigens that were not recognized by antibodies in pre-immune serum. Note (i) how, although some antigens reacted strongly with antibodies from most human sera, none reacted with all sera (**a** and **b**), and (ii) the great variability of antibody specificities among individual rabbits, both in terms of “natural” (pre-immune) antibodies and of cross-reactive, post-immunization antibodies (**c**). **p** = pre-immune serum; **i** = immune serum.

**Fig. 2.** Using sera producing false-negative results to obtain relevant recombinant antigens (rAgs). (**a**) Scheme of the procedure employed to improve an immunoassay for diagnosis of visceral leishmaniasis. (**b**) Number of sera from patients with visceral leishmaniasis recognizing at least one rAg in panels with increasing number of *L. chagasi* amastigote rAgs. The additional rAgs in the 5- and 6-antigen panels, in relation to the 4-antigen panel, were selected from a cDNA library as described in (**a**). Closed areas in the columns represent the number of sera producing positive results in an immunoenzymatic dipstick assay, in which each recombinant antigen was exposed separately to the sera, whereas the total height of the columns represent the total number of sera tested (22 or 54 sera).

**FIGURE 1**



**FIGURE 2**



#### 4.4 ARTIGO IV: Immunization protocol to obtain antigen-specific cellular immune responses for the *in vitro* and *in vivo* assessments of anti- *Leishmania infantum* immune responses in dogs

##### JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO:

Apesar de o cão ser considerado o principal reservatório doméstico da *L. infantum/chagasi*, a eliminação de cães soropositivos não reduziu a incidência da LV humana e/ou canina no Brasil (DYE, 1996), provavelmente devido à baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos utilizados e à demora entre a detecção e a eliminação dos animais soropositivos (BRAGA, 1998; REITHENGER & DAVIES, 2002). Desta forma, o desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral tem sido considerado prioridade para a Organização Mundial de Saúde. Entretanto, para os estudos preliminares sobre o potencial imunogênico de moléculas de *Leishmania* candidatas a componentes de uma vacina canina, é necessário um modelo experimental que forneça animais com resposta imune celular detectável contra antígenos do parasito. A obtenção dos cães imunologicamente respondedores na área endêmica demanda a captura de diversos animais, que, mesmo estando infectados, podem apresentar supressão da resposta imune celular, tornando-se uma abordagem de custos elevados e extremamente laboriosa.

Alguns estudos demonstraram indução de resposta imune celular anti-*Leishmania* em cães por meio da imunização com lisado parasitário (PINELLI, 1994) ou infecção com promastigotas vivos utilizando a via intradérmica (KILLICK-KENDRICK, 1994; LEANDRO, 2001). Neste trabalho testamos um esquema de imunização de cães visando a obtenção de animais respondedores a antígenos de *L. infantum/chagasi* através da injeção de lisado de promastigotas e posterior inoculação de promastigotas vivos por via subcutânea. A indução de resposta imune humoral e celular contra antígenos totais e proteínas recombinantes foram avaliadas antes e após a infecção dos animais.

## RESULTADOS:

Cães injetados com lisado de promastigotas emulsionado em adjuvante de Freund produziram pouca atividade, porém significativa, de anticorpos IgG anti-*Leishmania* no ELISA. Após a inoculação de promastigotas virulentos, ocorreu um aumento da reatividade de anticorpos específicos, sendo mais evidente com 45 semanas de infecção. Dois, de quatro animais, também exibiram resposta humoral contra a proteína recombinante Lc13.

Apesar do aumento de anticorpos após duas injeções de lisado parasitário, não foi observada reatividade de linfócitos *in vitro*, nos cães imunizados com lisado. Apenas após a infecção dos animais observou-se resposta imune celular a antígenos totais e recombinantes de *L. infantum*, determinada pelo ensaio de linfoproliferação. Além disso, todos os cães apresentaram, aos 45 dias de infecção, reação de hipersensibilidade tardia positiva quando injetados por via intradérmica com antígenos de *Leishmania*. Três de quatro animais foram também positivos no teste cutâneo para a proteína recombinante Lc13 e um para a Lc9.

Apesar do isolamento do parasito em cultura de aspirados esplênicos de dois animais, não ocorreu desenvolvimento de sintomatologia. Os dados sugerem que a infecção sub-clínica em cães inoculados por via subcutânea com promastigotas, independentemente ou não da injeção prévia de lisado do parasito, é capaz de estimular eficientemente tanto a resposta imune humoral quanto a celular. O modelo testado neste trabalho pode ser bastante útil na seleção e/ou em ensaios imunobiológicos de antígenos de *Leishmania* promissores para o desenvolvimento de vacinas e/ou métodos imunoterápicos.

\* Artigo submetido para publicação em periódico indexado

Running headline: *Leishmania* immune responses in dogs

**Title:**

Immunization protocol to obtain antigen-specific cellular immune responses for the *in vitro* and *in vivo* assessments of anti-*Leishmania infantum* immune responses in dogs

**Authors:**

Márcia Cristina Aquino Teixeira<sup>1,2,3</sup>, Geraldo Gileno de Sá Oliveira<sup>1</sup>, Márcio Silva Rodrigues<sup>1</sup>, Rute Franca Sousa<sup>1</sup>, Virgínia Maria Góes da Silva<sup>1</sup>, Daniela Farias Lorangeira<sup>1</sup>, Washington L. Conrado dos-Santos<sup>1,3</sup>, Lain Pontes-de-Carvalho<sup>1,3</sup>

**Institutional affiliations:**

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão 121, Brotas 40295-001. <sup>2</sup>Faculdade de Tecnologia e Ciências - FTC, Av. Paralela 8812, Pituaçu 41820-785. <sup>3</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Fundação para Desenvolvimento das Ciências - FDC, Av. Dom João VI 275, Brotas 40290-000, Salvador, Bahia, Brasil.

---

**Address for correspondence:**

Márcia Cristina Aquino Teixeira, Laboratório de Patologia e Biointervenção - LPBI, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão 121, 40.295-001, Salvador, Bahia, Brasil. Telephone: 5571-356-8781/257; FAX: 5571-356-2155

E-mail address: [marciat@cpqgm.fiocruz.br](mailto:marciat@cpqgm.fiocruz.br)

## Abstract

Domestic dogs are the main reservoirs of zoonotic visceral leishmaniasis. In this work, we have evaluated a protocol to induce *Leishmania infantum*-specific cellular and humoral immune responses in dogs, consisting in two injections of *Leishmania* promastigote lysate followed by the subcutaneous inoculation of viable promastigotes. Specific lymphoproliferative responses either to *Leishmania* lysate or to recombinant proteins were observed only after infection of the animals. At 45 weeks of infection, dogs remained healthy and exhibited positive delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* crude antigens and to purified recombinant proteins. The circulating levels of anti-*Leishmania* antibody increased after inoculation of viable promastigotes. The injection of dogs with live promastigotes by the subcutaneous route appears to induce a sustained cellular immune response leading to asymptomatic infection, which provides a useful model both for the selection of immunogenic *Leishmania* antigens and for immunobiological studies on their possible immunoprotective activities.

Key words: *Leishmania infantum* - dogs - immunization - cellular immune response

## Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) is becoming an increasing worry in public health due to its spreading to previously non-endemic rural areas, to the emergence of disease foci in urban areas and, more recently, to its opportunistic association with HIV infection (Jerônimo et al. 1994; Marzochi et al. 1994; Alvar 1994; Molina et al. 1999; & el-Rassan 2001).

Pieces of evidence for the role played by dogs as domestic reservoirs of *Leishmania infantum* have been reported: first, the frequent presence of *Leishmania-infected* dogs in domestic and peridomestic areas; second, the high seropositivity rates in dogs from endemic areas and third, the intense skin parasitism of sick dogs, making the *Leishmania* theoretically exposed to the sand fly (Peters & Killick-Kendrick 1987; Abranches 1991; Travi et al. 2001). Vector control using insecticides, treatment of human cases and serological surveys, followed by culling of seropositive canines, are the main control measures adopted in Brazil. However, the massive elimination of dogs between 1990 and 1997 did not reduce the incidence of the human disease (Costa et al. 2000).

Studies on natural and experimental *L. infantum* infections of dogs indicate that many animals develop asymptomatic infections, probably due to an efficient cellular immune response against the parasite (Cabral et al. 1992; Pinelli et al, 1994a), suggesting that a canine vaccine is feasible (Dye 1996). To assess the efficacy of a vaccine against canine leishmaniasis it is desirable and/or necessary to monitor or quantify some biologic parameters, such as: (1) the development of clinical signs of disease; (2) the production of antibodies against *Leishmania* antigens; (3) the elicitation of antigen-specific proliferative responses and/or the production of cytokines in antigen-stimulated peripheral blood mononuclear cells; (4) the elicitation of skin hypersensitivity to inoculated antigens and, finally, (5) the determination of the infectivity of the immunized dogs to sand flies.

One of the major problems in studying canine immune responses to *Leishmania* antigens is the lack of an easy source of antigen-specific canine lymphocytes to be used as positive controls in biological assays for cell-mediated immunity. Studies in Brazilian endemic areas have shown 20-25% seroprevalences of canine leishmaniasis in different endemic areas (Paranhos-Silva et al. 1996; Nunes et al. 2001; Silva et al. 2001). However, among the seropositive canines, many symptomatic animals have low cellular immune responses



(de Luna et al. 1999; Moreno et al. 1999; Conrado dos-Santos et al. manuscript in preparation), decreasing the availability of donors of *Leishmania* antigen-responder lymphocytes. Thus, obtaining these positive control dogs from a large canine population in *Leishmania* endemic areas is an expensive, labor-intensive and inefficient fieldwork.

Data available on canine experimental *Leishmania* infection are difficult to compare because of differences in inoculum sizes, inoculation routes and parasite stages used for infection (reviewed in Moreno and Alvar 2002). However, those data show that symptomatic disease can be obtained by infecting dogs with high parasite inocula, with amastigote forms and/or using the intravenous route for infection (Rhalem et al. 1999; Campino et al. 2000), while infections by the intradermal route seems to induce long pre-patent periods and stimulate cell-mediated immune responses (Killick-Kendrick et al. 1994; Leandro et al. 2001). The induction of specific cellular immune responses in dogs, as assessed by lymphoproliferation and skin delayed type hypersensitivity (DTH) reaction, by immunizations with lysed parasites (Pinelli et al. 1994b; Mayrink et al. 1996) or with a *Leishmania* antigen fraction (Borja-Cabrera et al. 2002) has also been reported.

In this study, aiming at obtaining a source of *Leishmania* antigen-responder lymphocytes for cell-mediated immunity assays in dogs, *L. infantum* specific-cellular and humoral immune responses were evaluated *in vivo* and *in vitro* in different moments of an immunization protocol (after injection of a *Leishmania* promastigote lysate and after the subsequent inoculation of viable promastigotes). The results indicate that the induction of *L. infantum* sub-clinical infection, following the immunization with parasite crude antigens, is better than the immunization with parasite antigens alone in terms of eliciting both humoral and cellular immune responses.

## **Materials and methods**

### Parasite and Antigens

The *Leishmania* used was isolated from the bone marrow of a human patient and identified as *L. infantum* (MHOM/BR2000/Merivaldo2 strain). The parasite was kept by passages into golden hamsters and cultivation in Schneider's drosophila medium (Sigma, St. Louis,

MO., USA), supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), at 22° C, pH 7.2. For immunization and detection of antibodies in dog serum by ELISA, promastigotes were washed by centrifugation with 0.15 M phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS) and lysed by sonication (five cycles of 30 seconds at 80% output with intermediate cooling cycles of 1 min; Branson sonifier 450W, Branson Instruments, Danbury, CT). The lysate was kept at -20° C until used. The Lc9 (a kinesin) and Lc13 (a heat shock protein) *Leishmania* recombinant proteins, encoded by plasmids constructed with *L. infantum* amastigote cDNA, were expressed in *Escherichia coli* and purified by inclusion body (insoluble aggregate of overexpressed protein) isolation protocols (Sambrook et al. 1989; Babu et al. 2000) or by immobilized metal-ion affinity chromatography using nickel-chelating Sepharose Fast Flow columns (Amersham Pharmacia Biotechnology, Sweden; Jedrzejewski et al. 1998), respectively. The degree of purity of the recombinant antigens was analyzed by sodium dodecylsulphate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by Coomassie blue staining. The protein content of each antigen preparation was determined by protein reaction with fluorescamine (Lorenzen and Kennedy 1993). For the lymphoproliferative assays, crude and purified antigens were dialysed against RPMI medium and sterilized by gamma-ray irradiation.

#### Animals and experimental design

Seven mixed-bred dogs, two- to four-year old, were obtained from the Salvador City Zoonosis Control Center, and kept in a kennel at the Gonçalo Moniz Research Center, Salvador, Bahia, with daily recreation in a dedicated area. All dogs were examined and treated when necessary for anemia, intestinal and ectoparasites, and received routine vaccination against leptospirosis, distemper, adenoviruses, parainfluenza and parvoviruses during an acclimatization period. All dogs were confirmed to be free of *Leishmania* by absence of parasites in spleen aspirate cultures and of specific antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence (Paranhos et al. 1996). Periodical surveys of the kennel for the presence of vectors of *Leishmania*, performed with the use of light traps, produced negative results. Animals were divided in two groups of four (group I)

and three (group II) dogs. Group I was subjected to the following subcutaneous injection protocol, with intervals of three to four weeks between injections/inoculation: (a) one injection of a lysate corresponding to  $1 \times 10^8$  *Leishmania* promastigote in complete Freund adjuvant, (b) a second injection of the same amount of *Leishmania* promastigote lysate in incomplete Freund adjuvant and (c) an inoculation of  $1 \times 10^8$  live stationary phase *Leishmania* promastigotes. Group II (the control group) was treated at the same time intervals with saline and adjuvants and then only saline instead of viable promastigotes. The cellular and humoral immune responses against *Leishmania* were evaluated three weeks after the second lysate injection and at 6 and 45 weeks after the live parasite inoculation. Spleen aspirates were collected every three months after the inoculation of viable promastigotes and were cultured in biphasic medium (blood agar-Schneider's medium). The animals were clinically monitored by a veterinary doctor throughout the experiment, which was conducted in accordance with the Oswaldo Cruz Foundation guidelines for the use of experimental animals.

## ELISA

Microtiter plate (Corning Laboratory Science Co., NY, USA) wells were coated overnight at 4° C with 2 µg of *Leishmania* lysate or 0.05 µg of *Leishmania* recombinant protein in 100 µl volumes of 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) per well. Wells were washed three times with PBS containing 0.05% Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) and blocked with PBS containing 5% dried skimmed milk for 1 hr at 37° C. After three washing procedures, the wells were incubated with 100 µl of 1/400 dilutions of test sera in PBS containing 3% (dry w/v) skimmed milk and 0.05% Tween 20 for 1 hr at 37° C. The wells were washed again as before and 100 µl of an anti-dog IgG peroxidase conjugate (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), diluted 1/2000, were added and incubated for 1 hr at 37° C. The wells were then washed before the addition of hydrogen peroxide and o-phenyldiamine (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA). The reaction was stopped after 20 minutes by the addition of 25 µl of 2 N sulfuric acid and the color intensity at 450-nm wave-length light read in a microtiter reader. Positive control sera from dogs with parasitologically proven infections, and negative control sera from dogs from a leishmaniasis non-endemic area and

with negative spleen cultures, were included in all plates. Optical densities above the cut-off were considered positive. The cut-off corresponded to the mean O.D. obtained with three negative control sera included in the assay plus this mean O.D. times 2 S.D. of the mean O.D. obtained with 53 sera from dogs coming from *Leishmania*-free areas divided by this latter mean O.D., where O.D. equals optical density and S.D. equals standard deviation.

#### Lymphocyte proliferation assay

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by centrifugation on a Ficoll (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) - RPMI medium solution and washed three times at 4° C with RPMI medium. Viable cells were adjusted to  $2 \times 10^6$  in RPMI supplemented with 10% of heat-inactivated FBS,  $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$  of gentamycin and  $2 \text{ mM.ml}^{-1}$  of L-glutamine (complete medium). Two hundred  $\mu\text{l}$  containing  $2 \times 10^5$  cells were then cultured in complete medium in the presence of  $4 \mu\text{g.ml}^{-1}$  of concanavalin A (Con A; Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) for three days or with  $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$  of *Leishmania* lysate,  $0.5 \mu\text{g.ml}^{-1}$  of Lc13 or  $16 \mu\text{g.ml}^{-1}$  of Lc9, for five days. These antigen and mitogen concentrations were found to be optimal, in previous assays, utilizing PBMC of naturally infected dogs. All cultures were carried out in flat-bottomed microtiter plates (Corning Laboratory Science Co., NY, USA), in triplicate, in a 100% humid atmosphere at 37° C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were pulsed during the last 18 hours of culture with 1  $\mu\text{Ci}$  of [<sup>3</sup>H] thymidine (Amersham-Pharmacia Biotech, England) and harvested onto glass fiber filters utilizing a cell harvester. Radioactivity uptake was measured in a liquid scintillation beta counter. Proliferative responses were expressed as stimulation index (SI), calculated by dividing the mean of counts of stimulated cultures by the mean of counts of non-stimulated ones. Stimulation indices equal or higher than 2.5 were considered to be indicative of proliferation.

#### Delayed-type hypersensitivity reaction

The skin test was performed as described before (Paranhos-Silva et al., 2001) using freeze-thawed, lysed *L. infantum* promastigotes, diluted in sterile saline as antigen. Dogs were injected intradermally, at different sites of the abdomen, with (a) 100  $\mu\text{l}$  of lysate

containing 250 µg of protein, (b) different concentrations of purified Lc13 (50, 25 and 12.5 µg.ml<sup>-1</sup>) and Lc9 (100, 50 and 25 µg.ml<sup>-1</sup>) recombinant proteins or (c) saline alone. Intradermal induration was measured 48 and 72 hours after antigen injection. Reactions showing diameter equal or larger than 5 mm were considered positive. The skin test was performed by the end of the experiment, after all lymphoproliferative and serological assays had been carried out, since the injection of promastigote lysate in the skin, for diagnostic reasons, may stimulate by itself an anti-*Leishmania* immune response (Nascimento et al. 1993).

## Results

Specific antibody responses against total or recombinant antigens of *L. infantum*

All dogs exhibited low, but significant levels of circulating IgG anti-*L. infantum* activity after two injections of promastigote lysate (Table I). Six weeks after the subcutaneous inoculation with virulent promastigotes, the antibody levels either remained constant (dogs C and D) or increased (dogs A and B) (Table I). A large increase in anti-*L. infantum* antibodies production was observed in three out of four dogs at 45 weeks after infection. Reactivity of the serum antibodies against the Lc13 recombinant protein was observed in two animals (dogs B and C) at 45 weeks after viable promastigote inoculation. None of the animals had detectable serum antibodies against the Lc9 protein during the follow-up period (data not shown). Sera from the control group had no detectable anti-*Leishmania* antibodies (Table I).

Lymphoproliferative response

Proliferative responses to *Leishmania* crude antigens were not observed after two subcutaneous injections of *L. infantum* lysate (Fig. 1A). These were observed only after inoculation of live promastigotes, and were considerably higher after 45 weeks than after 6 weeks of the infection in three of the four dogs (Fig 1A). After 45 weeks of infection, all animals responded to Lc13, while two of the four dogs (animals C and D) responded to Lc9

protein, with a mean SI of 6.6 and 4.5, respectively (Fig 1B). No PBMCs from animals of the control, non-immunized group had lymphoproliferative responses to the *L. infantum* lysate or to the recombinant proteins (Fig. 1B). PBMCs from dogs of both groups showed high levels of proliferation when stimulated with mitogen. The response of different animals to Con A varied over the period of the experiment, ranging between a S.I. of 31.9 and 64.6 for immunized dogs and between 18.2 and 75.3 for control animals (data not shown).

#### Delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* crude and recombinant antigens

All dogs from the infected group had positive skin test reactions at the site of injection of *L. infantum* crude antigens, varying from 10 to 30 mm at 48 hours and from 7 to 26 mm at 72 hours (Table II). Three experimentally infected animals had larger reactions at 48 hours, whereas one dog had an increase of induration's area at 72 hours (Table II). Three of four dogs from the infected group were reactive to higher concentrations of Lc13 and one dog responded to both Lc13 and Lc9 (Table II). No positive reactions were detected in the three control dogs.

#### Clinical and parasitological evaluation

The presence of parasite in spleen aspirate cultures was observed in two of the four infected animals (dogs B and D) 6 months after promastigote inoculation. All spleen cultures were negative 18 months post-infection. No clinical signs of VL, such as loss of weight, cachexia, alopecia, onychogryphosis, or any other disease signs, were observed during the experiment period. Dogs from the control group also remained healthy and had all spleen cultures negative during the follow-up period.

#### Discussion

Very few studies have described attempts at inducing cellular immune responses in dogs by injecting *Leishmania* lysates. There is one study on the immunization of dogs with

*Leishmania* promastigote antigens that aimed at specifically generating *Leishmania*-responder T cells (Pinelli et al. 1994b). In that work, the soluble fraction of a *Leishmania infantum* lysate was mixed with dimethyl dioctadecyl ammonium bromide and injected by the subcutaneous route. Of the three immunized beagles, two had a weak and one had an intense *in vitro* lymphocyte response to antigenic stimulation (Pinelli et al. 1994b). In the study described herein, cellular immune response to *Leishmania* antigens was not induced in any of the four animals injected twice with *Leishmania* total lysate. The contrast observed between studies might be due to different dog breeds, antigen preparation or adjuvant used. However, it is worthy to point out the variation in the induction of lymphoproliferative responses among immunized animals reported in the work referred to above (Pinelli et al. 1994b).

Attempts at inducing specific cellular immune response in dogs, after injection of crude antigens, have also been carried out in a vaccination trial against canine leishmaniasis. The immunization of dogs with a partly purified *L. infantum* preparation, administered with the muramyl dipeptide adjuvant, which had previously been shown to protect mice against *Leishmania*, led to exacerbation of the disease. Peripheral blood cells reactivity to *Leishmania* antigens was not determined (Dunan et al. 1989).

Whereas some authors have reported that experimental infection of dogs with amastigotes or promastigotes by the intravenous route produced signs of visceral disease, but less pronounced than in natural infection (Nieto et al. 1999; Rhalem et al. 1999; Campino et al. 2000), other authors have reported the development of asymptomatic infections after inoculation of either *Leishmania* promastigotes by the intradermal or intravenous route or amastigotes by the intravenous route (Abranches et al. 1991; Oliveira et al. 1993; Santos-Gomes et al. 2000; Leandro et al. 2001), even using inocula as high as  $10^8$  promastigotes per kg of body weight. The lack of consistency and reproducibility may be due to various factors, such as route of inoculation, size of inocula, stage of parasite and dog breed (reviewed by Moreno & Alvar, 2002). Despite these variations, different experimental models with specific purposes could be established instead of a single model of canine VL. For selection of antigens with immunological properties, the desirable dog model would be one with apparently healthy animals with cellular immune response to *Leishmania* antigens (disease resistant dogs).

The poor immunogenicity of promastigote lysates for dogs, demonstrated in the work reported herein (an *in vitro* cellular reactivity to *Leishmania* antigens was not observed in any of the animals after two injections of a promastigote crude antigen emulsified in Freund adjuvant) is consistent with the result described by Dunan et al. (1989). On the other hand, the increase in antibody production and the elicitation of lymphoproliferative response following the infection of the dogs with *Leishmania*, suggests that parasite-host interactions during the course of infection favors the triggering of both cellular and humoral anti-*Leishmania* immune responses in dogs. This is further confirmed by the observation that by 45 weeks after infection, all dogs had positive skin reactions to *Leishmania* crude antigens, three dogs responded to the Lc13 recombinant antigen and one dog responded to both the Lc9 and the Lc13 recombinant antigens. All the infected dogs were healthy by that time, which is consistent with reports that positive delayed type hypersensitivity against *Leishmania* in dogs is associated with resistance against *Leishmania* infection (Pinelli et al. 1994a; Solano-Gallego et al. 2000). The present results also corroborate the finding that the infection of dogs with promastigotes induced an intense cellular response (Killick-Kendrick et al. 1994; Santos-Gomes et al. 2000; Leandro et al. 2001).

Paranhos-Silva and collaborators (2003) reported the development of a sub-clinical infection in dogs intradermally injected with virulent promastigotes. Small increase in antibody levels was observed after 11 months post infection, which might be due to the low inoculum used (around  $10^5$  promastigotes) compared to the present study ( $10^8$  promastigotes), in which an intense antibody reactivity to *Leishmania* crude antigen was observed at the same period after infection. Only non-specific lymphoproliferative response to mitogen was evaluated in that work. Even after infection by intravenous route with high promastigote inoculum, low antibody reactivity was observed in beagles (Leandro et al. 2001). As protection against canine leishmaniasis has been associated to cell-mediated immunity (Pinelli et al. 1994a), the aim of this study was to obtain a dog model with detectable T-cell responses to *Leishmania* antigens, and not a dog model of canine VL. The model can also be valuable to determine the isotypes of IgG antibodies against leishmanial proteins. Anti-*Leishmania* IgG1 antibodies have been associated to the development of clinical disease and IgG2 antibodies to asymptomatic infections (Nieto et al. 1999; Leandro et al. 2001).



The dog genetic background is a very important factor in the outcome of experimental infection. It may be more appropriate to use mixed-breed dogs in experimental models in order to represent more accurately the genetic diversity of the dog population in *Leishmania* endemic areas. In fact, the Ibizian hound dogs rarely develop clinical leishmaniasis, probably due to a more uniform cellular response to infection to *Leishmania* than other dog breeds (Solano-Galego et al. 2000). In the experiments described herein, mongrel dogs, similar to the ones found inhabiting the Brazilian Bahia state endemic areas, were used.

Reports on humoral and cellular immune responses to purified recombinant antigens in *Leishmania*-infected dogs are very limited. Experimentally or naturally infected sick dogs were seropositive for anti-rK39 antibodies, while sera from asymptomatic animals with natural infection did not react with this protein, suggesting that there is a significant correlation between antibody reactivity to rK39 and appearance of clinical symptoms. Unfortunately, rK39 was not tested in blastogenic assays (Rhalem et al. 1999). Antibody levels in a naturally infected canine population recognizing type I cysteine proteinases (CP) were higher in asymptomatic animals than in animals with VL. On the other hand, PBMC reactivity remained low in presence of CP, although always higher for PBMC recovered from asymptomatic dogs (Nakhaee et al. 2004). The present study indicates that antibodies against proteins of Hsp70 family are produced in the course of infection, as reported previously (Quijada et al. 1995), and that antibody reactivity against *Leishmania* kinesins could inversely correlate with a T-cell response, once no animals produced antibodies against Lc9 and PBMCs from half of them had a positive lymphoproliferative response during the experiment observation period. These results indicate that the dog model described herein can be useful for attempts to identify antigens associated with immune protection in resistant dogs.

In the present study, in which dogs were inoculated with *Leishmania* promastigotes subcutaneously, even the two dogs from which parasites were isolated from spleen did not develop any sign of disease. The absence of symptoms despite the production of antibodies, lymphoproliferative response and skin reactions to *L. infantum* in the infected animals suggest host-parasite equilibrium in this dog experimental model.

Dogs living in a VL endemic area can be divided into three categories: first, dogs with negative antibody response, but with *in vitro* lymphoproliferative responses to *Leishmania* antigens; second, positive dogs with anti-*Leishmania* antibodies but without anti-*Leishmania* lymphoproliferative responses and, third, dogs positive for both responses (reviewed in Gradoni, 2001). The experimental infection of dogs with *L. infantum* promastigotes by the subcutaneous route, following immunization with *L. infantum* lysate, described herein, led to asymptomatic infections with both humoral and cellular immune response to *Leishmania* antigens, providing animals that could perhaps belong to the third category cited above.

In the present work, the dogs, previous to infection, were immunized with promastigote lysates in Freund's adjuvant. The elicitation of the strong immune responses, both cellular and humoral, were clearly not associated with the immunization – three weeks after the immunization, the cellular immune response was undetectable in a lymphoproliferative assay and low levels of anti-*L. infantum* antibodies were produced by the animals. This picture completely changed after the infection, with increasing cellular immune responses that persisted for more than 24 months after the infection (not shown). The present experiment, however, cannot exclude a possible enhancing or suppressive role of the previous immunization with parasite lysates on the immune response, later elicited or greatly enhanced by the infection. In order to investigate this point, a group of infected, non-immunized animals would have to be included in a study as the one reported herein. Both ethical and financial aspects should be considered before carrying out this proposed study, since the model reported herein, involving the inoculation of dogs with alive promastigotes by the subcutaneous route, following two subcutaneous injections of a *Leishmania* lysate, independently of the requirement for these previous subcutaneous injections, seems to induce a sustained cellular immune response, as assessed *in vitro* by lymphoproliferation and *in vivo* by delayed hypersensitivity, leading to an asymptomatic infection. The model could therefore be useful for both the selection and immunobiological studies of immunogenic *Leishmania* antigens, as also as a positive control for *L. infantum*-specific cellular immune responses in initial trials of canine vaccine candidates.

## **Acknowledgments**

This work was supported by Federal Ministry of Science and Technology, Brazil (PRONEX, PADCT and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq), and the CADCT/FAPESB, State Government of Bahia, Brazil. The infection experiments were conducted in accordance with the Oswaldo Cruz Foundation guidelines for experimentation with animals.

## References

- Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 77: 557-561.
- Alvar J 1994. Leishmaniasis and AIDS co-infection. The Spanish example. *Parasitol Today* 10: 160-163.
- Babu KR, Swaminathan S, Marten S, Khanna N, Rinas U 2000. Production of interferon-alpha in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 655-660.
- Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB 2002. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). *Vaccine* 20: 3277-3284.
- Cabral M, O'Grady J, Alexander J 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell-mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol* 14:531-539.
- Campino L, Santos-Gomes G, Rica Capela MJ, Cortes S, Abranches P 2000. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Vet Parasitol* 92: 269-275.
- Costa CHN, Gomes RBB, Silva MRB, Garcez LM, Ramos PKS, Santos RS, Shaw JJ, David JR, Maguire JH 2000. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. *J Infect Dis* 182: 997-1000.
- Dunan S, Frommel D, Manjour L, Ogunkolade BW, Cruz A, Quilici M 1989. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunol* 11: 397-402.
- Dye C 1996. The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg* 55:125-130.
- Gradoni L 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol* 100: 87-103.

- Jedrzejak MJ, Mewbourne RB, Chantalat L, McPherson DT 1998. Expression and purification of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 13: 83-89.
- Jerônimo SM, Oliveira, RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, Fernandes MZ, Jernigan J, Pearson RD 1994. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 386-388.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Pinelli E, Del Real G, Molina R, Vitutia MM, Canavate MC, Nieto J 1994. A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite* 1: 311-318.
- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolao N, Gomes-Pereira S, Rica Capela MJ, Abranches P 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* 79: 273-284.
- Lorenzen A, Kennedy SW 1993. A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Anal Biochem* 214: 346-348.
- de Luna R, Vuotto ML, Ielpo MT, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 70: 95-103.
- Mayrink W, Genaro O, Silva JC, da Costa RT, Tafuri WL, Toledo VP, da Silva AR, Reis AB, Williams P, da Costa PW 1996. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 695-657.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW 1994. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today* 10: 37-40.
- Molina R, Lohse J.M, Pulido F, Laguna F, Lopez-Velez R, Alvar J 1999. Infection of sand flies by humans co-infected with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg* 60: 51-53.
- Moreno J, Nieto J, Chamizo C, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC, Alvar J 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 71: 181-195.

- Moreno J, Alvar J 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18: 399-405.
- Nakhaee A, Taheri T, Taghikhani M, Mohebbali M, Salmanian AH, Fasel N, Rafati S 2004. Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. *Vet Parasitol* 119: 107-23.
- Nascimento MD, Alcantara-Neves NM, Muniz ME, Nunes SF, Paranhos M, de Carvalho LC 1993. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87: 91-93.
- Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena JM, Miron C, Soto M, Alonso C, Navarrete I 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 67: 117-130.
- Nunes VL, Galati EA, Nunes DB, Zinazzi RO, Savani ES, Ishikawa E, Camargo MC, D'Auria SR, Cristaldo G, Rocha HC 2001. Occurrence of canine visceral leishmaniasis in an agricultural settlement in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 299-300.
- Ogunkolade BW, Vouldoukis I, Frommel D, Davoust B, Rhodes-Feuillette A, Monjour L 1988. Immunization of dogs with a *Leishmania infantum*-derived vaccine. *Vet Parasitol* 28: 33-41.
- Oliveira GG, Santoro F, Sadigursky M 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 243-248.
- Paranhos-Silva M, Freitas LA, Santos WC, Grimaldi GJr, Pontes-de-Carvalho LC, Oliveira-dos-Santos, AJ 1996. A cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 55: 39-44.
- Paranhos-Silva M, Pontes-de-Carvalho LC, de Sa Oliveira GG, Nascimento EG, dos-Santos WL 2001. Skin reactions to thimerosal and *Leishmania* in dogs from a leishmaniasis endemic area: it is better to keep them apart. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 96: 679-81.
- Peters W, Killick-Kendrick R 1987. The leishmaniasis in Biology and Medicine (Vols. I and II), Academic Press.

- Pinnelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernardina W, del Real G, Ruitenbergh J 1994a. Cellular and humoral immune response in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 62: 229-235.
- Pinelli E, Boog CJ, Rutten VP, van Dijk B, Bernadina WE, Ruitenbergh EJ 1994b. A canine CD8+ cytotoxic T-cell line specific for *Leishmania infantum*-infected macrophages. *Tissue Antigens* 43: 189-192.
- Quijada L, Requena JM, Soto M, Alonso C. 1996. During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. *Parasitology* 112: 277-84.
- Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B 1999. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 81: 173-184.
- Santos-Gomes GM, Campino L., Abranches P 2000. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 193-198.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 17.39.
- Silva ES, Gontijo CM, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP 2001. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 65: 896-898.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L 2000. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 90: 37-45.
- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osório Y 2001. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg* 64: 119-124.
- Zijlstra EE, el-Hassan AM 2001. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(Suppl 1): S27-58.

TABLE I

IgG anti-*Leishmania* antibodies in the sera of dogs exposed (group I) or non-exposed (group II) against *Leishmania infantum* lysate and the Lc13 recombinant antigen

Group	Dog	IgG anti- <i>Leishmania</i> lysate				IgG anti-Lc13 recombinant protein			
		Before immunization	3 weeks after last of two lysate injections	6 weeks after infection	45 weeks after infection	Before immunization	3 weeks after last of two lysate injections	6 weeks after infection	45 weeks after infection
I	A	0.033 <sup>a</sup>	0.202	0.495	2.013	0.120	0.086	0.117	0.130
	B	0.190	0.379	0.802	3.038	0.141	0.256	0.278	1.706
	C	0.198	0.446	0.541	3.584	0.199	0.226	0.397	0.772
	D	0.109	0.405	0.442	0.657	0.108	0.079	0.086	0.115
II	E	0.155	0.032	0.174	0.128	0.131	0.109	0.096	0.124
	F	0.142	0.177	0.124	0.212	0.138	0.142	0.107	0.154
	G	0.102	0.110	0.088	0.040	0.076	0.101	0.089	0.106

a: mean O.D. at 460 nm obtained by ELISA, from duplicates of an 1:400 serum dilution.



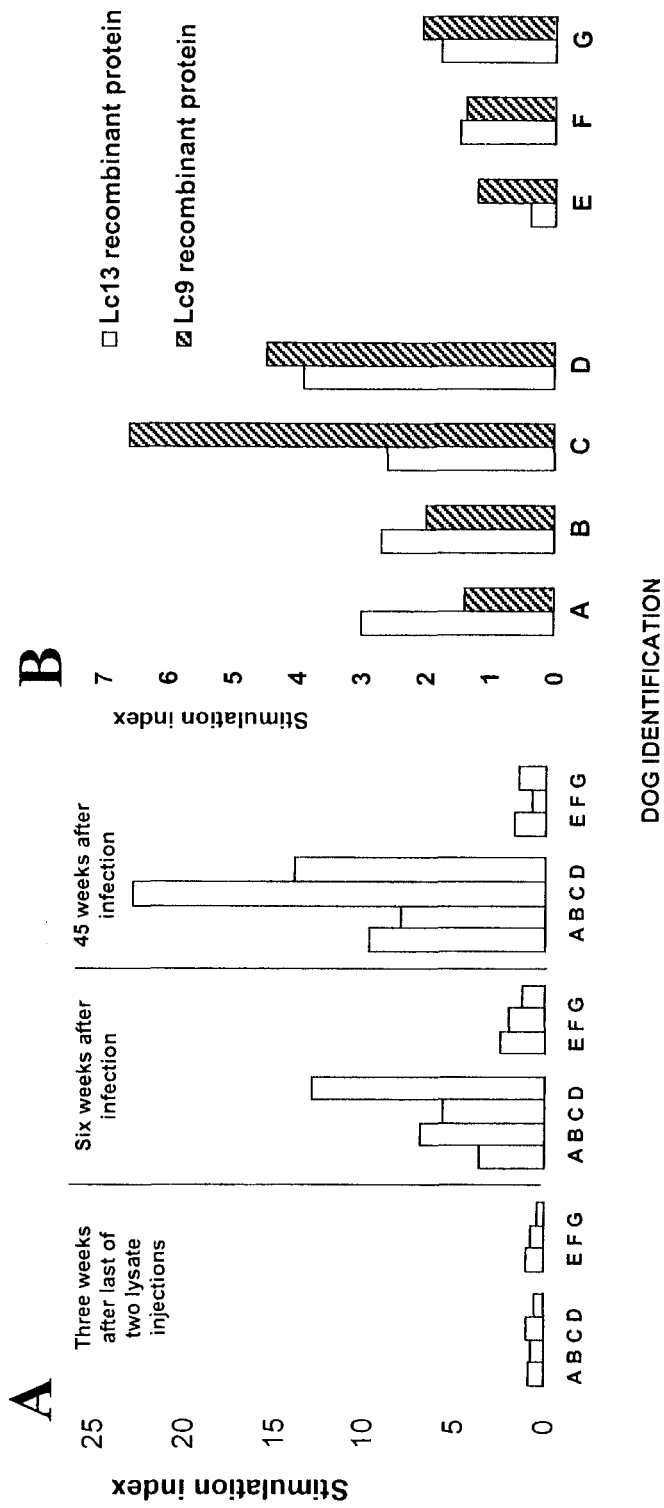
TABLE II  
Skin reactions to a *Leishmania infantum* lysate and to the Lc9 and Lc13 *L. infantum* recombinant antigens in dogs 45 weeks after infection with *L. infantum*

Group	Dog	Time of reaction reading	Diameter of skin indurations (mm) after injection of								
			Saline	250 µg of <i>L. infantum</i> lysate	25 µg of Lc9	50 µg of Lc9	100 µg of Lc9	12.5 µg of Lc13	25 µg of Lc13	50 µg of Lc13	
I	A	48 <sup>a</sup>	0	10	0	0	0	0	0	5	7
		72	0	7	0	0	0	0	0	8	7
	B	48	0	24	0	4	6	0	9	4	
		72	3	20	0	7	8	0	8	3	
	C	48	3	30	0	0	0	0	0	4	
		72	0	22	0	0	0	0	0	10	
	D	48	0	22	0	0	0	0	0	0	
		72	0	26	0	0	0	0	0	0	
II	E	48	2	4	0	0	0	0	0	4	
		72	0	0	0	0	0	0	0	4	
	F	48	0	3	0	0	0	0	0	3	
		72	0	0	0	0	0	0	0	0	
	G	48	0	0	0	0	0	0	0	0	
		72	0	0	0	0	0	0	0	0	

a: Hours after intradermal injection of dogs with 100 µl of antigens or saline at different sites of the abdomen.

**Legend to figure**

Fig 1: Lymphoproliferative response to *Leishmania* antigens in *Leishmania infantum* immunized dogs. A, proliferative response of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultures stimulated with *L. infantum* promastigote lysate at different time points during the follow-up period; B, proliferative response of PBMC cultures stimulated with *L. infantum* Lc9 and Lc13 recombinant proteins after 45 weeks of infection. Each column represents the result obtained from an individual animal identified by the letter under its base. Animals A to D were immunized with *L. infantum* as described in the Materials and Methods; animals E to G were injected with saline only.



**Figure 1**

## 5 DISCUSSÃO

No hospedeiro mamífero a *Leishmania* se reproduz exclusivamente na forma aflagelada, dentro dos macrófagos, determinando nestas células alterações morfológicas e bioquímicas. Antígenos secretados pelas formas amastigotas, através da bolsa flagelar no interior do fagolisossomo (CHAKRABORTY, 1997), ou antígenos presentes na superfície de macrófagos parasitados (WILLIAMS, 1986), já foram descritos. Dentre os eventos determinantes das modificações morfológicas e bioquímicas que ocorrem durante a transformação de promastigotas em amastigotas, estão a mudança de temperatura e pH. Inicialmente, quando promastigotas são inoculados pelo flebotomíneo na pele do hospedeiro vertebrado, estas formas são expostas a temperaturas mais elevadas, entre 31-35° C, ou até 37° C nas vísceras (ZILBERSTEIN, 1994). Uma vez internalizado no fagolisossomo, o parasito sofre novas agressões pela célula hospedeira, incluindo uma elevada concentração de prótons, com pH ao redor de cinco (ANTOINE, 1990).

Neste trabalho de tese, padronizamos as condições de cultivo axênico para obtenção de amastigotas de *L. infantum/chagasi*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, variando especificamente a temperatura de incubação das culturas, pH e quantidade de soro bovino fetal do meio (ARTIGO I). Em condições específicas para cada espécie de *Leishmania*, ocorreu a transformação das formas promastigotas iniciais em amastigotas extracelulares. Diferentemente das outras espécies de *Leishmania* testadas, o tempo requerido para diferenciação de *L. infantum/chagasi* foi longo, levando à morte celular e redução da viabilidade dos parasitos, apesar do número elevado de amastigotas nas culturas (90%). Devido à heterogeneidade dos resultados obtidos com culturas axênicas de *L. infantum/chagasi*, comparando com aqueles obtidos com as outras espécies de *Leishmania* testadas, e o tempo relativamente longo requerido por esta espécie para a diferenciação *in vitro* em amastigotas, em trabalhos subseqüentes como, por exemplo, a imunização de coelhos para obtenção de anticorpos contra antígenos de amastigotas e a extração de RNA para produção de uma biblioteca de cDNA de *Leishmania*, foram utilizados amastigotas intracelulares, purificados de baço de hamsters infectados com esta espécie de parasito.

Além de morfologicamente distintas, as formas evolutivas promastigotas também apresentam um repertório de antígenos diferentes daqueles encontrados na forma

amastigota intracelular, tanto em nível de resposta imune celular (SADICK, 1985) quanto humoral (CIBRELUS, 1999). Considerando que a forma amastigota é aquela encontrada no hospedeiro mamífero, sendo responsável pela patogênese da doença (ALEXANDER, 1999), moléculas expressas exclusivamente nesse estágio podem ser alvos importantes da resposta imune.

A transformação de promastigotas em amastigotas é um processo gradual, com formação de estágios intermediários. Embora os dados apresentados neste trabalho demonstrem várias semelhanças entre os amastigotas extracelulares e os amastigotas de macrófagos, os amastigotas de cultivo axênico podem representar um dos estágios finais de diferenciação. De fato, o padrão de reconhecimento dos antígenos de amastigotas de cultivo axênico por soros de camundongos infectados com *Leishmania*, apresentou um perfil intermediário entre o obtido com as formas promastigotas e o obtido com as formas amastigotas de lesão (ARTIGO I). Apesar disso, a cultura axênica de amastigotas, descrita no presente trabalho, pode fornecer moléculas parasitárias estágio-específicas que podem ser úteis a uma série de estudos morfológicos, imunológicos e bioquímicos.

Até a década de setenta, a leishmaniose visceral era considerada quase que exclusivamente rural. Todavia, importantes centros urbanos do país têm registrado casos desta doença, inclusive capitais como Terezina e Belo Horizonte. Na Bahia, entre os anos de 1995 e 1997, o número médio de casos anuais, que se encontrava em torno de 600, chegou a atingir cerca de 1.400 notificações por ano (SESAB-SUS, 2002). Além do aumento nítido do número de casos da endemia, a invasão de áreas urbanas facilitou o encontro da parasitose com a SIDA (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1999), gerando quadros clínicos graves nos pacientes com ambas as infecções.

O programa brasileiro de controle da LV é composto principalmente por três medidas de saúde pública: distribuição gratuita do quimioterápico específico (antimônio pentavalente), controle de reservatórios domésticos e controle de vetores. O controle dos reservatórios tem sido feito através do diagnóstico sorológico de todos os cães domésticos onde existe a transmissão do parasito para seres humanos, com posterior sacrifício de todos os cães soropositivos para anticorpos anti-*Leishmania*. Entre os pontos frágeis desta medida de controle, e provavelmente, a explicação pela falta de êxito, estão a baixa sensibilidade

dos testes sorológicos e a grande velocidade de reposição da população canina retirada da área endêmica (DYE, 1996; BRAGA, 1998)

Estudos de comparação de técnicas sorodiagnósticas da LVC demonstraram que o teste de IFI usando eluato sanguíneo, amplamente utilizado no Brasil, foi de 1,8 até 4,6 vezes menos sensível que o ELISA utilizando soro (EVANS, 1990; BRAGA, 1998). Em relação ao sorodiagnóstico da LV humana, a técnica de Western blotting demonstrou ser mais sensível que o ELISA e a IFI, principalmente pela reatividade dos soros com as proteínas de 14 e 16 kDa de *L. infantum* (MARY, 1992). Ensaios com elevada sensibilidade são particularmente importantes no diagnóstico de LV em pacientes com SIDA, porque os testes sorológicos convencionais nesses pacientes são freqüentemente negativos (PETERS, 1990; MARY, 1992). Por outro lado, devido à alta sensibilidade do “Western blot”, podem ocorrer reações cruzadas com soros de pacientes com malária, citomegalovírus, tuberculose e doença renal crônica (MARY, 1992). Além disso, a técnica não é muito prática, dificilmente sendo utilizada na rotina de um laboratório clínico. A utilização de proteínas recombinantes permitiria o desenvolvimento de ensaios diagnósticos mais práticos como ELISA ou testes imunocromatográficos, estes últimos particularmente interessantes em estudos epidemiológicos tanto da LV humana quanto canina, mantendo-se algumas características desejáveis do “Western blot” (ARTIGO III).

Com o objetivo de identificar antígenos potencialmente candidatos para o desenvolvimento de ensaios mais específicos e sensíveis para o sorodiagnóstico da LV, ou com papel protetor como candidato a componente de uma vacina, clones de uma biblioteca de cDNA foram selecionados, utilizando soros de cães ou indivíduos infectados com *Leishmania*. Um dos clones de cDNA isolados, denominado Lc13, mostrou sequência homóloga a proteína de choque térmico Hsp70. As Hsp são alvos importantes da resposta imune em diversas doenças parasitárias como malária, tripanossomose, esquistossomose, filariose e leishmaniose (revisado por MURRAY, 1992; KAUFMAN, 1999). Durante a infecção por *Leishmania*, as Hsp são alvos imunodominantes. De fato, cerca de 70% dos clones de uma biblioteca de cDNA de *L. donovani*, identificados utilizando soro de paciente com calazar, eram membros da família Hsp70 ou Hsp90 (DE ANDRADE, 1992). Em nosso estudo, a triagem inicial de produtos de expressão da biblioteca de cDNA, utilizando soros de cães com infecção natural, porém assintomáticos, forneceu 30 antígenos

recombinantes. Após o sequenciamento parcial das extremidades com os primers universais T3 e T7, foi determinado que 24 (80%) dos antígenos eram homólogos de Hsp70 de *L. major*.

Durante a exposição a altas temperaturas (43-37° C), diferentes espécies de *Leishmania* sintetizam Hsp, o que acompanha as modificações estruturais que determinam a transformação de promastigotas em amastigotas (ZILBERSTEIN, 1994). Contrariamente ao fato de serem as proteínas mais bem conservadas na escala evolutiva, as Hsp são importantes alvos da resposta imune celular e humoral em diversas patologias, incluindo a tripanossomose e a leishmaniose visceral (DE ANDRADE, 1992; QUIJADA, 1998; REQUENA, 2000). Embora as proteínas Hsp70 recombinantes não discriminem bem infecções por *Leishmania* daquelas causadas por *T. cruzi*, ou mesmo sejam reconhecidas por indivíduos normais (ARORA, 1995), existem epitopos de células B em regiões imunodominantes que são espécie-específicos (QUIJADA, 1996). Regiões menos conservadas da Hsp83 (=Hsp90), assim como a Hsp70, também podem ser utilizadas no diagnóstico da LV, uma vez que 90% de soros de cães infectados foram capazes de reconhecer a proteína recombinante inteira ou um subfragmento altamente antigênico (ANGEL, 1996). É possível que peptídeos pequenos induzam uma resposta específica e peptídeos grandes ou a proteína inteira estimulem respostas contra regiões não-específicas.

Outro antígeno recombinante bastante utilizado no diagnóstico sorológico da LV é o rK39, uma cinesina recombinante de *L. infantum/chagasi*. Este antígeno permitiu a distinção entre doença ativa, infecções assintomáticas e fase de convalescença (SCALONE, 2002). Além de detectar casos de LV, o ELISA-rK39 demonstrou também ser um teste sensível e específico para o sorodiagnóstico da leishmaniose dérmica pós-calazar na Índia (SINGH, 1995). Os elevados títulos de anticorpos observados nesses pacientes parecem estar associados ao número de epitopos K39 do parasito presentes, uma vez que uma quimioterapia eficaz leva à redução drástica da atividade de anticorpos anti-K39 (SINGH, 1995). Desta forma, além do valor diagnóstico, o K39 poderia também ser utilizado como marcador prognóstico de evolução da doença.

Entre os diferentes antígenos selecionados da biblioteca de cDNA de *Leishmania* aqui produzida, uma proteína foi homóloga, porém não idêntica, ao K39 descrito inicialmente por BURNS e colaboradores (1993). A análise filogenética do domínio motor

de cinesinas identificou cinco grupos distintos de genes, com 14 diferentes tipos de cinesinas representando os grupos, apresentando funções celulares diversificadas. Evidências sugerem que pelo menos dois grupos da família das cinesinas estejam presentes na maioria dos, ou mesmo em todos, os eucariotas (GOODSON, 1994). Em termos de imunodiagnóstico da LV, a proteína recombinante Lc9 aqui isolada, pode ser igualmente antigênica, em comparação com a rK39, para seres humanos ou cães infectados com *L. infantum/cahagasi*, ou mesmo possuir, devido a variação de algumas seqüências de nucleotídeos, epitopos de célula B diferentes daqueles reconhecidos no K39.

O achado de títulos de anticorpos anti-K39 em pacientes com leishmaniose visceral no Brasil e Sudão (BURNS, 1993), e na China e Paquistão (QU, 1994), indicam que o epitopo K39 é conservado entre as espécies visceralizantes de *Leishmania*, como também revela sua alta antigenicidade. Em ensaios iniciais para o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico para diagnóstico da LV humana, desenvolvidos em nosso laboratório, cerca de 90% dos soros (20 de 22 amostras) de pacientes com leishmaniose visceral, apresentaram reatividade com Lc9 em ensaio de “dot blot” (SILVANY, 2002). Através de testes preliminares de ELISA, desenvolvidos neste trabalho de tese, foi avaliada a antigenicidade da proteína recombinante Lc9 para crianças com LV provenientes de uma área endêmica no Maranhão, e para um grupo de cães de Monte Gordo, outra área endêmica próxima a Salvador, Bahia (estudo em andamento, dados preliminares não publicados). Doze (80%) das 15 crianças com diagnóstico parasitológico de LV foram positivas no ELISA-Lc9. Dos 33 cães soropositivos no ELISA tradicional utilizando lisado de promastigotas, 30 (91%) reagiram com Lc9. Tanto soros de cães assintomáticos, quanto de animais doentes, foram capazes de reagir com Lc9, porém reatividade mais elevada foi observada nos animais com sinais característicos da LV, corroborando dados previamente publicados mostrando associação de altos títulos de anticorpos anti-K39 e progressão clínica da doença (SINGH, 1995; BRAZ, 2002). A proteína recombinante Lc13 também foi reconhecida por anticorpos de crianças (53%) e cães (88%) infectados com *L. infantum/chagasi*, porém com menor freqüência do que aquela observada com Lc9. Ensaios para determinação da especificidade do ELISA com Lc9 e Lc13 purificados ainda não foram realizados.



A diversidade da resposta humoral nos diferentes hospedeiros de *Leishmania* já foi documentada. O perfil de frações antigênicas reconhecidas por pacientes com LV mostrou-se bastante variável (VEXENAT ADE, 1996), podendo ser evidenciadas até 29 bandas, variando de 8 a 250 kDa em ensaios de Western blot, utilizando antígeno solúvel de *L. infantum/chagasi*. Alguns desses antígenos, como proteínas de 32-35 kDa, têm sido considerados espécie-específicos, reagindo apenas com soro de pacientes com *L. infantum/chagasi* (REED, 1987), e outros antígenos, de 19, 36 e 70 kDa têm mostrado reatividade cruzada (BRITO, 2000). Diversos ensaios sorológicos utilizando antígenos recombinantes também foram descritos (BURNS, 1993; SOTO, 1995; GHEDIN, 1997; QUIJADA, 1998; NAKHAE, 2004). Um estudo interessante, comparando o desempenho no ELISA de 10 antígenos recombinantes diferentes de *Leishmania*: rgp63, rK39, rGPB, R histonas H2 A e H2 B, rLACK, rP20 e 3 variações de rPSA-2, demonstrou que apenas o ELISA com rK39 apresentou-se melhor que o clássico ELISA que utiliza extrato solúvel de *Leishmania*, com 94% de sensibilidade e 100% de especificidade (MAALEJ, 2003). Apesar de pioneiro nesse tipo de comparação, o estudo utilizou um painel de soros relativamente pequeno e deixou de analisar soros de pacientes com doenças que provavelmente cursariam com a produção de anticorpos reagindo cruzado com *L. infantum/chagasi*, como por exemplo, a doença de Chagas.

A nossa proposta de trabalho foi obter proteínas recombinantes de *L. infantum* com potencial para serem utilizadas no sorodiagnóstico da LV, preferencialmente em combinações de antígenos capazes de conferir alta sensibilidade aos ensaios sorológicos. No presente trabalho, 22 soros de pacientes, com LV confirmada no exame parasitológico, foram testados por “dip stick” frente a um painel de quatro antígenos recombinantes seleccionados da biblioteca de cDNA por meio da reatividade com soro de cães infectados. Os soros não-reativos a este painel, porém positivos no ELISA ou Western blot, foram utilizados para buscar novos antígenos na biblioteca. A estratégia de seleção de proteínas em bibliotecas gênicas de *Leishmania*, utilizando soros falso-negativos é simples e pode fornecer um painel de antígenos capazes de detectar anticorpos em 53 de 54 soros de pacientes com LV sem perda da especificidade (ARTIGO III).

Diversos antígenos indutores de proteção parcial através de uma resposta Th1 predominante foram identificados e clonados, tais como: Lcr1 (WILSON, 1995), gp63

(XU, 1995), gp46/M-2 (MCMAHON-PRATT, 1993), Hsp70 (SKEIKY, 1995) e LmSTII (WEBB, 1998). Mesmo antígenos capazes de contribuir na patogênese da doença como papLe22 (uma proteína recombinante de *L. infantum* de 22 kDa), através do estímulo da produção de IL-10, foi clonado visando a reorientação da resposta agravante da doença em uma resposta protetora (SUFFIA, 2000). Apesar de induzirem proteção contra a leishmaniose em modelos murinos, moléculas como por exemplo, a gp46 e gp63 são preferencialmente expressas na forma promastigota. Como discutido acima, proteínas encontradas na forma amastigota podem ser importantes para a sobrevivência do parasito, servindo como candidatos potenciais no desenvolvimento de uma vacina.

Em relação à imunidade na leishmaniose visceral canina, alguns estudos sugerem que a resistência ou a susceptibilidade em cães infectados com *L. infantum/chagasi*, assim como no modelo murino para leishmaniose cutânea, pode estar relacionado com a resposta dicotômica de linfócitos T (PINELLI, 1994; BOURDOISEAU, 1997). Uma resposta Th1 que produz IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 é importante para a proteção e uma resposta Th2, que produz IL-4 e IL-10, resulta em doença (SCOTT, 1988; LIEW, 1994).

Para avaliação de proteínas de *Leishmania* quanto à capacidade indutora de resposta imune protetora em cães, é necessário a disponibilidade de um modelo experimental. A infecção de cães com *L. infantum/chagasi* pode reproduzir a infecção natural e servir a diversos estudos de vacinação de cães. Dependendo do tipo (promastigota ou amastigota), e da quantidade de parasitos do inóculo, a infecção experimental pode induzir a quadros clínicos desde assintomáticos até doença aparente com sinais como: alopecia, onicogribose, ceratite e anorexia, entre outros. Para ensaios de vacinação, ou testes de eficácia de imunológico ou quimioterápicos, é desejável modelos de infecção que induzam a progressão da doença, o que pode ser conseguido através da injeção de amastigotas ou pelo uso de altos inóculos de promastigotas por via endovenosa (HOMMEL, 1995). Entretanto, para seleção de antígenos indutores de resposta imune celular, ou mesmo como controle interno de ensaios de resposta de células T a antígenos de *Leishmania*, é necessário um modelo animal capaz de produzir esse tipo de resposta imune. No presente trabalho, cães normais, livres de infecção, foram imunizados através de duas injeções de lisado de promastigotas e posteriormente inoculados com promastigotas vivos por via subcutânea. A imunização utilizando lisado induziu uma resposta discreta de anticorpo nos animais, enquanto que a

infecção sub-clínica desenvolvida levou a um aumento rápido da produção de anticorpos e à detecção nítida de resposta imune celular contra antígenos totais e recombinantes de *L. infantum* (ARTIGO IV). Os anticorpos produzidos durante a infecção subclínica foram capazes de reconhecer indistintamente proteínas de promastigotas e de amastigotas, apresentando, entretanto, maior reatividade com as formas evolutivas intracelulares (ARTIGO II). Embora o modelo não exclua a possibilidade de um efeito estimulador ou mesmo inibitório, induzido pela imunização prévia com lisado, na resposta imune observada após inoculação com promastigotas vivos, a infecção subcutânea mostrou claramente ser mais eficiente que a injeção de lisado parasitário em estimular resposta imune celular anti-*Leishmania*. Mesmo após 24 meses de infecção, essa resposta ainda é detectável e o isolamento de parasitos de aspirados esplênicos, embora com resultados variáveis, é conseguido (dados não mostrados). Células mononucleares de sangue periférico desses animais têm sido utilizadas constantemente como controle positivo interno de ensaios de proliferação em nosso laboratório. Embora o objetivo central do trabalho tenha sido o desenvolvimento de um protocolo experimental para produção de resposta imune celular *in vivo* e *in vitro* (ARTIGO IV), o estudo também forneceu dados quanto a antigenicidade das proteínas recombinantes em termos da resposta imune celular. Lc13 induziu resposta linfoproliferativa nos quatro cães e Lc9 em dois destes. No teste de hipersensibilidade cutânea três cães foram positivos para Lc13 e um para Lc13 e Lc9. Apesar dos dados serem bastante preliminares, os resultados apontam para o possível uso dessas proteínas em ensaios de proteção de cães contra a LV em associação com outros antígenos recombinantes e/ou adjuvantes e estimuladores de resposta imune do tipo Th1, como por exemplo, a IL-12.

## 6 CONCLUSÕES

- Os resultados dos ensaios de padronização das condições para cultivo extracelular de amastigotas de *Leishmania* demonstraram que promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são mais facilmente induzidas à diferenciação em amastigotas axênicas do que a *L. infantum/chagasi*. A purificação de formas intracelulares de esplenócitos de hamsters infectados parece ser uma melhor alternativa em ensaios de obtenção de amastigotas desta espécie.
- Apesar da imunodominância de antígenos da família Hsp durante a infecção por *Leishmania*, soros de cães infectados com *L. infantum/chagasi* foram capazes de reconhecer pelo menos cinco grupos diferentes de antígenos recombinantes de uma biblioteca de cDNA, incluindo uma proteína da família das cinesinas.
- Soros de pacientes com padrão de reconhecimento restrito de proteínas de *Leishmania*, fornecendo resultados negativos em determinados ensaios sorológicos, podem ser utilizados para busca de novos antígenos em bibliotecas de cDNA de *Leishmania*, os quais poderiam aumentar a sensibilidade de métodos sorológicos para o diagnóstico da LV.
- A infecção sub-clínica de animais experimentais representa uma boa estratégia de obtenção de anticorpos específicos para formas evolutivas amastigotas. Em três espécies de animais diferentes: cão, coelho e camundongo, a infecção com promastigotas vivos foi mais eficiente na indução da produção de anticorpos anti-amastigotas do que protocolos de imunização por via subcutânea, mesmo quando foi utilizado lisado desta forma evolutiva nas inoculações.
- Além da produção de anticorpos anti-*Leishmania*, a infecção sub-clínica de cães através da inoculação subcutânea com promastigotas virulentos foi mais eficaz que a injeção de lisado parasitário em termos de indução de resposta imune celular contra antígenos brutos e recombinantes de *L. infantum*. Este modelo experimental

pode ser útil na triagem de antígenos imunogênicos de *Leishmania*, bem como servir de controle positivo em estudos *in vitro* de moléculas candidatas a componentes de uma vacina canina.

## 7 AVANÇOS E PERSPECTIVAS DO PRESENTE ESTUDO

Este trabalho de tese faz parte de um projeto maior intitulado “Controle da Leishmaniose Visceral: Desenvolvimento de Vacina e Métodos Imunodiagnósticos”, no qual outros estudantes de doutorado, mestrado e técnicos de nível superior estão envolvidos, trabalhando em diferentes aspectos do projeto.

Atualmente, alguns antígenos selecionados da biblioteca de cDNA utilizando soros caninos, considerados pelo sequenciamento parcial como sendo de grupos diferentes (denominados Lc9, Lc13, Lc14, Lc18 e Lc30), foram completamente seqüenciados, com exceção do Lc30, o qual, devido à existência de vários domínios repetitivos de DNA, dificultando o seqüenciamento, só foi possível determinar cerca de dois terços da seqüência completa de nucleotídeos. Além disso, foram também definidas as seqüências de nucleotídeos de dois antígenos (Lc121 e Lc131) selecionados da biblioteca com soros de pacientes com LV.

Ensaio de otimização da expressão de cada uma das proteínas codificadas pelos insertos utilizando *Escherichia coli* TOP10F' ou BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) foram iniciados. Inicialmente, as proteínas Lc18 e Lc131 foram super-expressas, porém não houve expressão satisfatória de proteínas pelas construções de plasmídeo pBK-CMV-Lc14 e pBK-CMV-Lc30. Visando a expressão de cadeias polipeptídicas de Lc14, foram realizadas subclonagens de segmentos do cDNA em plasmídeo pRSET. As novas construções pRSET-Lc14R (extremidade 5' repetitiva) e pRSET-Lc14NR (extremidade 3' não-repetitiva) foram super-expressas em *E. coli* BLR. Métodos para a purificação dessas proteínas, através de eletroeluição ou por cromatografia de afinidade (colunas de Sepharose-níquel), foram padronizados. As proteínas purificadas serão utilizadas na validação em condições de laboratório experimental de testes “dip stick” com os antígenos recombinantes purificados para diagnóstico das leishmanioses viscerais humana e canina. Esta validação envolverá o acréscimo (selecção de novos antígenos com soros falso-negativos) ou remoção (retirada de antígenos com resposta redundante ou que leve a perda de especificidade) de proteínas obtidas a partir da biblioteca de cDNA ou genômica de *L. infantum/chagasi*.

Em relação aos avanços no desenvolvimento de uma vacina canina, grupos de animais foram injetados com as proteínas recombinantes purificadas Lc9 e Lc13, utilizando como adjuvante saponina, na presença ou não de plasmídeo codificando IL-12 canina, clonada em nosso laboratório. Duas semanas após a última injeção foi observada a produção nítida de anticorpos contra as duas proteínas. Não foi encontrada diferença entre os grupos que receberam apenas antígenos com saponina e os que receberam antígenos com saponina associados ao plasmídeo. O experimento continua em curso e a avaliação da resposta imune celular será realizada através de ensaio de linfoproliferação e expressão de citocinas por RT-PCR.

A capacidade de um plasmídeo codificando um antígeno específico de estimular células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> é desejável em ensaios de proteção, principalmente contra doenças como a leishmaniose. Além disso, diferentes combinações gênicas de antígenos ou de antígenos mais adjuvantes podem ser inseridos em um único plasmídeo. Desta forma, entre os avanços obtidos no desenvolvimento do projeto, está a expressão *in vivo* dos plasmídeos que codificam Lc9 e Lc13 em camundongos. Camundongos injetados com os referidos plasmídeos foram capazes de produzir anticorpos contra as proteínas Lc9 e Lc13, reconhecidas em ELISA e no Western blot. Relatos anteriores demonstraram que a imunização de camundongo com DNA induziu maior proteção contra a infecção por *L. major* do que a proteína recombinante purificada, mesmo quando associada a um potente adjuvante de resposta do tipo Th1 como a IL-12 (GURUNATHAN, 1997). Portanto, uma das estratégias do projeto é a possibilidade de utilizar os plasmídeos, codificando as proteínas recombinantes imunogênicas, em uma vacina de DNA contra a LV canina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; CAMPINO, L.; SANTOS-GOMES, G M. [Canine leishmaniasis. New concepts of epidemiology and immunopathology: their impact in the control of human visceral leishmaniasis]. **Acta Med. Port.**, **11**:871-875, 1998.
- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C.; CONCEICAO-SILVA, F. M.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **J. Parasitol.**, **77**:557-561, 1991.
- AGUILAR, C. M.; FERNANDEZ, E.; FERNANDEZ, R.; CANNOVA, D. C.; FERRER, E.; CABRERA, Z.; SOUZA, W. J.; COUTINHO, S. G. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**:15-16, 1998.
- AHMED, S.B.; BAHLOUL, C.; ROBBANA, C.; ASKRI, S.; DELLAGI, K. A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experimental murine leishmaniasis due to *L. major*. **Vaccine** **22**:1631-9, 2004.
- AISA, M.J.; CASTILLEJO, S.; GALLEGRO, M.; FISA, R.; RIERA, M.C.; DE COLMENARES, M.; TORRAS, S.; ROURA, X.; SENTIS, J.; PORTUS, M. Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **58**:154-159, 1998.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J. Cell Sci.**, **112**:2993-3002, 1999.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR, B.; JIMENEZ, M.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, **10**:298-319, 1997.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZALEZ, F.; SAN ANDRES, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **88**:371-378, 1994.
- ANGEL, S. O.; REQUENA, J. M.; SOTO, M.; CRIADO, D.; ALONSO, C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. **Acta Trop.**, **62**:45-56, 1996.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect. Immun.**, **58**:779-787, 1990.



ANTUNES, C. M.; MAYRINK, W.; MAGALHAES, P. A.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S.; WILLIAMS, P.; LIMA, A. O.; VIEIRA, J. B.; et al. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Epidemiol.**, **15**:572-580, 1986.

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

ARORA, S. K.; MELBY, P. C.; SEHGAL, S. Lack of serological specificity of recombinant heat shock protein of *Leishmania donovani*. **Immunol. Cell Biol.**, **73**:446-451, 1995.

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

ASHFORD, D. A.; BADARO, R.; EULALIO, C.; FREIRE, M.; MIRANDA, C.; ZALIS, M. G.; DAVID, J. R. Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **48**:1-8, 1993.

BADARO, R.; JONES, T. C.; LORENCO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR, W. D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **J. Infect. Dis.**, **154**:639-649, 1986.

BALANCO, J. M.; PRAL, E. M.; DA SILVA, S.; BIJOVSKY, A. T.; MORTARA, R. A.; ALFIERI, S. C. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, **116**:103-113, 1998.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N. S.; JEN, S.; BADARO, R.; REED, S. G.; SKEIKY, Y. A. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **102**:249-261, 1999.

SESAB-SUS, SUVISA-DIVEP, Leishmaniose Visceral, **Bol. Epidemiol.**, ano VII, Número Especial, 2002.

BONGIORNO, G.; HABLUTZEL, A.; KHOURY, C.; MAROLI, M. Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. **Acta Trop.**, **88**:109-116, 2003.

BORGES, A. S.; MACHADO, A. A.; FERREIRA, M. S.; DE CASTRO, J. F.; SILVA, G. F.; CIMERMAN, S.; BACHA, H. A.; TEIXEIRA, M. C. Concurrent leishmaniasis and human immunodeficiency virus (HIV) infection: a study of four cases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32**:713-719, 1999.

BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DA SILVA, V. O.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; SANTOS, W. R.; GOMES, E. M.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.;

PALATNIK DE SOUSA, C. B. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). **Vaccine**, **20**:3277-3284, 2002.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally Leishmania infantum-infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **59**:21-30, 1997.

BRAGA, M. D.; COELHO, I. C.; POMPEU, M. M.; EVANS, T. G.; MACAULLIFE, I. T.; TEIXEIRA, M. J.; LIMA, J. W. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and slower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **31**:419-424, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1999.

BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R.; WILSON, M. E.; PEARSON, R. D.; REED, S. G.; JERONIMO, S. M. The sensitivity and specificity of Leishmania chagasi recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **67**:344-348, 2002.

BRITO, M. E.; MENDONCA, M. G.; GOMES, Y. M.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. Identification of potentially diagnostic Leishmania braziliensis antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **7**:318-321, 2000.

BURNS JUNIOR, J. M.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**:775-779, 1993.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, **14**:531-539, 1992.

CABRAL, M.; O'GRADY, J. E.; GOMES, S.; SOUSA, J. C.; THOMPSON, H.; ALEXANDER, J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.**, **76**:173-180, 1998.

CABRERA, G. P.; DA SILVA, V. O.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **61**:296-301, 1999.

CABRERA, M. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A.; MARZOCHI, M. C.; XAVIER, S. C.; DA SILVA, A. V.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **45**:79-83, 2003.

CARDOSO, L.; NETO, F.; SOUSA, J. C.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Vet. Parasitol.**, **79**:213-220, 1998.

CARVALHO, S. F.; LEMOS, E. M.; COREY, R.; DIETZE, R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **68**:321-324, 2003.

CARVALHO, F. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E. P.; RABELLO, A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, **43**:289-295, 2002.

CARVALHO, E. M.; CORREIA FILHO, D.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**:273-277, 1995.

CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; REED, S. G.; JONES, T. C.; JOHNSON JUNIOR, W. D. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, **76**:2066-2069, 1985.

CERF, B. J.; JONES, T. C.; BADARÓ, R.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; RIOCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR, W. D. Malnutrition as risk factor for severe visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **156**:1030-1032, 1987.

CHAKRABORTY, P.; BASU, M. K. *Leishmania* phagolysosome: drug trafficking and protein sorting across the compartment. **Crit. Rev. Microbiol.**, **23**:253-268, 1997.

CIBRELUS, P.; PRECIGOUT, E.; SERENO, D.; CARCY, B.; LEMESRE, J. L.; GORENFLOT, A. Secreted antigens of the amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum* inducing a humoral response in humans and dogs. **Parasite**, **6**:121-129, 1999.

CHANG, K. P. Human cutaneous leishmaniasis in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science**, **209**:1240-1242, 1980.

COELHO, E. A.; TAVARES, C. A.; CARVALHO, F. A.; CHAVES, K. F.; TEIXEIRA, K. N.; RODRIGUES, R. C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect. Immun.**, **71**:3988-3994, 2003.

- COSTA, C. H.; GOMES, R. B.; SILVA, M. R.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K.; SANTOS, R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **J. Infect. Dis.**, **182**:997-1000, 2000.
- COSTA, C. H.; PEREIRA, H. F.; ARAUJO, M. V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. **Rev. Saúde Publ.**, **24**:361-372, 1990.
- COURTENA, Y. O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **J. Infect. Dis.**, **186**:1314-1320, 2002.
- DA SILVA, V. O.; BORJA-CABRERA, G. P.; CORREIA PONTES, N. N.; DE SOUZA, E. P.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C. B. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine**, **19**:1082-1092, 2000.
- DE ANDRADE, C. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E.; OTSU, K. Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. **J. Clin. Microbiol.**, **30**:330-335, 1992.
- DE LUNA, R.; VUOTTO, M. L.; IELPO, M. T.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **70**:95-103, 1999.
- DEPLAZES, P.; SMITH, N. C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol.**, **17**:451-458, 1995.
- DESJEU, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Stat. Q.**, **45**:267-275, 1992.
- DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, **25**:1240-1242, 1997.
- DOS SANTOS, L. R.; BARROUIN-MELO, S. M.; CHANG, Y. F.; OLSEN, J.; MCDONOUGH, S. P.; QUIMBY, Y. F.; DOS SANTOS, W. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA, G. G. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **98**:43-48, 2004.
- DUNAN, S.; FROMMEL, D.; MONJOUR, L.; OGUNKOLADE, B. W.; CRUZ, A.; QUILICI, M. Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phocian Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **11**:397-402, 1989.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**:125-130, 1996.

EVANS, T. G.; VASCONCELOS, I. A.; LIMA, J. W.; TEIXEIRA, J. M.; MCAULLIFE, I. T.; LOPES, U. G.; PEARSON, R. D.; VASCONCELOS, A. W. Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **42**:118-123, 1990.

FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; SIQUEIRA, A. M.; MACHADO-COELHO, G. L.; DA COSTA, C. A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E. P.; COSTA, J. S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, **111**:161-173, 2003.

GARCEZ, L.M.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T. Direct agglutination tests in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in the state of Pará. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **29**:165-180, 1996.

GAVGANI, A. S.; HODJATI, M. H.; MOHITE, H.; DAVIES, C. R. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet**, **360**:374-379, 2002.

GHEDIN, E.; ZHANG, W. W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R. T.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **4**:530-535, 1997.

GOODSON, H. V.; KANG, S. J.; ENDOW, S. A. Molecular phylogeny of the kinesin family of microtubule motor proteins. **J. Cell Sci.**, **107**:1875-1884, 1994.

GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Vet. Parasitol.**, **100**:87-103, 2001.

GUARGA, J. L.; LUCIENTES, J.; PERIBANEZ, M. A.; MOLINA, R.; GRACIA, M. J.; CASTILLO, J. A. Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs. **Acta Trop.**, **77**:203-207, 2000a.

GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M. J.; PERIBANEZ, M. A.; ALVAR, J.; CASTILLO, J. A. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Res. Vet. Sci.**, **69**:249-253, 2000b.

GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRACIA, M. J.; PERIBANEZ, M. A.; CASTILLO, J. A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **88**:13-20, 2002.

GUERRA, J. A.; BARROS, M. L.; FE, N. F.; GUERRA, M. V.; CASTELLON, E.; PAES, M. G.; SHERLOCK, I A. Visceral leishmaniasis among Indians of the State of Roraima, Brazil: clinical and epidemiologic aspects of the cases observed from 1989 to 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **37**:305-311, 2004.

GURUNATHAN, S.; SACKS, D. L.; BROWN, D. R.; REINER, S. L.; CHAREST, H.; GLAICHENHAUS, N.; SEDER, R. A. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, **186**:1137-1147, 1997.

GURUNATHAN, S.; WU, C. Y.; FREIDAG, B. L.; SEDER, R. A. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, **12**:442-447, 2000.

HANDMAN, E. *Leishmania* vaccines: Old and New. **Parasitol. Today**, **13**:236-238, 1997.

HANDMAN, E.; BUTTON, L. L.; MCMASTER, R. W. *Leishmania major*: production of recombinant gp63, its antigenicity and immunogenicity in mice. **Exp. Parasitol.**, **70**:427-435, 1990.

HANDMAN, E.; SYMONS, F. M.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J. M.; SCHEERLINCK, J. P. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. **Infect. Immun.**, **63**:4261-4267, 1995.

HART, D. T.; VICKERMAN, K.; COOMBS, G. H. A quick, simple method for purifying *Leishmania mexicana* amastigotes in large numbers. **Parasitology**, **v.8**:345-355, 1981.

HENDRICKS, L. D.; WOOD, D. E.; HAJDUK, M. E. Haemoflagellates: commercially available liquid media for rapid cultivation. **Parasitology**, **76**:309-316, 1978.

HERNANDEZ, J. A.; BOSCH, M. A.; SAUCA, G. Atypical clinical presentation of visceral leishmaniasis. **Haematologica**, **84**:750, 1999.

HODGKINSON, V. H.; SOONG, L.; DUBOISE, S. M.; MCMAHON-PRATT, D. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. **Exp. Parasitol.**, **83**:94-105, 1996.

HOMMEL, M.; JAFFE, C. L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **89**: 55-73, 1995. Suppl 1.

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **J. Infect.**, **39**:101-111, 1999.

HOWARD, J. Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. **Nature**, **389**: 561-567, 1997.

JERONIMO, S. M.; HIGGS, E.; VEDVICK, T.; MANN, B. J.; JERNIGAN, J.; PETRI JUNIOR, W. A.; PEARSON, R. D. Identification of *Leishmania chagasi* antigens recognized by human lymphocytes. **J. Infect; Dis.**, **172**:1055-1060, 1995.

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

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit. Rev. Microbiol.**, **21**:123-152, 1995.

KAUFMAN, R. J. Molecular chaperones and the heat shock response. Sponsored by Cold Spring Harbor Laboratory, 6-10 May 1998. **Biochim. Biophys. Acta**, **1423**:13-27, 1999.

KIMA, P. E.; SOONG, L.; CHICHARRO, C.; RUDDLE, N. H.; MCMAHON-PRATT, D. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. **Eur. J. Immunol.**, **26**:3163-3169, 1996.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, **273**:595-600, 1978.

LASRI, S.; SAHIBI, H.; SADAK, A.; JAFFE, C. L.; RHALEM, A. Immune responses in vaccinated dogs with autoclaved *Leishmania major* promastigotes. **Vet. Res.**, **30**:441-449, 1999.

LEANDRO, C.; SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ROMÃO, P.; CORTES, S.; ROLAO, N.; GOMES-PEREIRA, S.; RICA CAPELA, M. J.; ABRANCHES, P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **79**:273-284, 2001.

LIEW, F. Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, **32**:161-259, 1993.

LIEW, F. Y. Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. **Immunol. Lett.**, **43**:95-98, 1994.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; BEN SALAH, A.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **68**:312-320, 2003.

MACFARLANE, J.; BLAXTER, M. L.; BISHOP, R. P.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. Identification and characterisation of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. **Eur. J. Biochem.**, **190**:377-384, 1990.

- MARY, C.; LAMOUREUX, D.; DUNAN, S.; QUILICI, M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **47**:764-771, 1992.
- MARZOCHI, M. C. D. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral Leishmaniasis in Brasil - Emerging Anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Públ.**, **10**:359-375, 1994.
- MAURICIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, **119**:237-246, 1999.
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, **16**:188-189, 2000.
- MAYRINK, W.; GENARO, O.; SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; TAFURI, W. L.; TOLEDO, V. P.; DA SILVA, A. R.; REIS, A. B.; WILLIAMS, P.; DA COSTA, P. W. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**:695-697, 1996.
- MCMAHON-PRATT, D.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ZHANG, Y.; MANSON, K.; BERGMAN, C.; RIVAS, L.; RODRIGUEZ, J. F.; LOHMAN, K. L.; RUDDLE, N. H.; et al. Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. **Infect. Immun.**, **61**:3351-3359, 1993.
- MODABBER, F. Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis: of men and mice. **Parasitology**, **98**:S49-60, 1989. Suppl.
- MODABBER, F. Vaccines against leishmaniasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **89**:83-88, 1995. Suppl.
- MOHEBALI, M.; KHAMESIPOUR, A.; MOBEDI, I.; ZAREI, Z.; HASHEMI-FESHARKI, R. Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. **Vaccine**, **22**:4097-4100, 2004.
- MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **97**:29-45, 2003. Suppl 1.
- MOREIRA JUNIOR, E. D.; DE SOUZA, V. M.; SREENIVASAN, M.; LOPES, N. L.; BARRETO, R. B.; DE CARVALHO, L. P. Peridomestic risk factors for canine leishmaniasis in urban dwellings: new findings from a prospective study in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **69**:393-397, 2003.
- MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **71**:181-195, 1999.



MORRISON, A. C.; FERRO, C.; TESH, R. Host preferences of sand fly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **49**:68-75, 1993.

MURRAY, P. J.; YOUNG, R. A. Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. **J. Bacteriol.**, **174**:4193-4196, 1992.

NAKHAEE, A.; TAHERI, T.; TAGHIKHANI, M.; MOHEBALI, M.; SALMANIAN, A. H.; FASEL, N.; RAFATI, S. Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. **Vet. Parasitol.**, **119**:107-123, 2004.

OLOBO, J. O.; ANJILI, C. O.; GICHERU, M. M.; MBATI, P. A.; KARIUKI, T. M.; GITHURE, J. I.; KOECH, D. K.; MCMASTER, W. R. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis using recombinant *Leishmania* 'major surface glycoprotein' (gp63). **Vet. Parasitol.**, **60**:199-212, 1995.

OREN, R.; SCHNUR, L. F.; BEN YEHUDA, D.; MAYNER, V.; OKON, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Visceral leishmaniasis: a difficult diagnosis and unusual causative agent. **J. Infect. Dis.**, **164**:746-749, 1991.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; GOMES, E. M.; PARAGUAI-DE-SOUZA, E.; PALATNIK, M.; LUZ, K.; BOROJEVIC, R. *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **89**:390-393, 1995.

PAN, A. A. *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. **Exp. Parasitol.**, **58**:72-80, 1984.

PAN, A. A.; DUBOISE, S. M.; EPERON, S.; RIVAS, L.; HODGKINSON, V.; TRAUB-CSEKO, Y.; MCMAHON-PRATT, D. Developmental life cycle of *Leishmania*--cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. **J. Eukaryotic Microbiol.**, **40**:213-223, 1993.

PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI, G. J.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. a cross-sectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**:39-44, 1996.

PETERS, B. S.; FISH, D.; GOLDEN, R.; EVANS, D. A.; BRYCESON, A. D.; PINCHING, A. J. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. **Q. J. Med.**, **77**:1101-1111, 1990.

PENHA-FILHO, M.L. **Anticorpos monoclonais anti-*Leishmania chagasi*. Padronização da reação imunohistoquímica e produção de anticorpos visando a quantificação de antígenos.** 2003. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, Bahia.

- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, **62**:229-235, 1994.
- PRINA, E.; LANG, T.; GLAICHENHAUS, N.; ANTOINE, J. C. Presentation of the protective parasite antigen LACK by *Leishmania*-infected macrophages. **J. Immunol.**, **156**: 4318-4327, 1996.
- QU, J. Q.; ZHONG, L.; MASOOM-YASINZAI, M.; ABDUR-RAB, M.; AKSU, H. S.; REED, S. G.; CHANG, K. P.; GILMAN-SACHS, A. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **88**:543-545, 1994.
- QUIJADA, L.; REQUENA, J. M.; SOTO, M.; ALONSO, C. During canine viscerocutaneous leishmaniasis the anti-Hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. **Parasitology**, **112**:277-284, 1996a.
- QUIJADA, L.; REQUENA, J. M.; SOTO, M.; GOMEZ, L. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; ALONSO, C. Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. **Immunol. Lett.**, **52**:73-79, 1996b.
- QUIJADA, L.; REQUENA, J. M.; SOTO, M.; ALONSO, C. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, **63**:169-174, 1998.
- RACHAMIM, N.; JAFFE, C. L. Pure protein from *Leishmania donovani* protects mice against both cutaneous and visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **150**:2322-2331, 1993.
- RAMIRO, M. J.; ZARATE, J. J.; HANKE, T.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; LUCIENTES, J.; CASTILLO, J. A.; LARRAGA, V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine**, **21**:2474-84, 2003.
- RASSAM, M. B.; AL-NUAIMI, M. S.; ISSA, F. S. Affinity separation and partial characterization of serologically active *Leishmania donovani* antigens. **Ann Trop Med Parasitol.**, **78**: 35-41, 1984.
- REED, S. G.; BADARO, R.; LLOYD, R. M. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani* chagasi by human infection sera. **J. Immunol.**, **138**:1596-601, 1987.
- REED, S. G.; SCOTT, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. **Curr. Opin. Immunol.**, **5**:524-31, 1993.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.**, **13**:151-77, 1995.

REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. **Parasitol. Today.**, **16**:246-50, 2000.

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. **Trends Parasitol.**, **18**:289-90, 2002.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **Int. J. Parasitol.**, **34**:55-62, 2004.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; GUESSOUS-IDRISSI, N.; LASRI, S.; NATAMI, A.; RIYAD, M.; BERRAG, B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, **81**:173-84, 1999.

ROLLAND, L.; ZILBERFARB, V.; FURTADO, A.; GENTILINI, M. Identification of a 94-kilodalton antigen on *Leishmania* promastigote forms and its specific recognition in human and canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, **16**:599-608, 1994.

ROSATI, S.; ORTOFFI, M.; PROFITI, M.; MANNELLI, A.; MIGNONE, W.; BOLLO, E.; GRADONI, L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Clin Diagn. Lab. Immunol.**, **10**:1153-6, 2003.

SAAR, Y.; RANSFORD, A.; WALDMAN, E.; MAZAREB, S.; AMIN-SPECTOR, S.; PLUMBLEE, J.; TURCO, S. J.; ZILBERSTEIN, D. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **95**:9-20, 1998.

SADICK, M. D.; RAFF, H. V. *Leishmania tropica*: differences in the antigenicity of promastigotes and amastigotes. **Cell. Immunol.**, **91**:404-14, 1985.

SANTOS, C.V.C. **Produção de anticorpos monoclonais anti-amastigotas de *Leishmania chagasi***. 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMAO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **88**:21-30, 2002.

SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTI, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a

diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Parasitol.**, **104**:275-85, 2002.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.**, **168**:1675-84, 1988.

SENRA, M. S.; PIMENTEL, P. S. R.; SOUZA, P. E. F. P. Leishmaniose visceral em Santarém- PA: Aspectos gerais do controle, inquerito sorológico em cães e tratamento dos casos humanos. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **37**:47-59, 1982.

SILVANY, M.A.R. **Avaliação de antígenos recombinantes visando o desenvolvimento de teste imunodiagnóstico para a leishmaniose visceral.** 2001. 139f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ, Bahia.

SINGH, S.; GILMAN-SACHS, A.; CHANG, K. P.; REED, S. G. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. **J. Parasitol.**, **81**:1000-3, 1995.

SJOLANDER, A.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J. M.; BENGTSSON, K. L.; HANDMAN, E. Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. **Vaccine**, **16**:2077-84, 1998a.

SJOLANDER, A.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J. M.; HANDMAN, E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. **J. Immunol.**, **160**:3949-57, 1998b.

SKEIKY, Y. A.; GUDERIAN, J. A.; BENSON, D. R.; BACELAR, O.; CARVALHO, E. M.; KUBIN, M.; BADARO, R.; TRINCHIERI, G.; REED, S. G. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. **J. Exp. Med.**, **181**:1527-37, 1995.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet. Parasitol.**, **90**:37-45, 2000.

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L.; GARCIA, M.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; ALONSO, C. Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, **48**:209-14, 1995.

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L.; ALONSO, C. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **3**:387-91, 1996.

SUFFIA, I.; FERRUA, B.; STIEN, X.; MOGRABI, B.; MARTY, P.; ROUSSEAU, D.; FRAGAKI, K.; KUBAR, J. A novel *Leishmania infantum* recombinant antigen which elicits interleukin 10 production by peripheral blood mononuclear cells of patients with visceral leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **68**:630-6, 2000.

VEXENAT, A. D. E. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA A. R. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38**:177-85, 1996.

VINHAS, V.; FREIRE, M.; BACELLAR, O.; CUNHA, S.; ROCHA, H.; CARVALHO, E. M. Characterization of T cell responses to purified *Leishmania* antigens in subjects infected with *Leishmania chagasi*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **27**:1199-205, 1994.

WEBB, J. R.; KAUFMANN, D.; CAMPOS-NETO, A.; REED, S. G. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. **J. Immunol.**, **157**:5034-41, 1996.

WEBB, J. R.; CAMPOS-NETO, A.; OVENDALE, P. J.; MARTIN, T. I.; STROMBERG, E. J.; BADARO, R.; REED, S. G. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. **Infect. Immun.**, **66**:3279-89, 1998.

WILLIAMS, K. M.; SACCI, J. B.; ANTHONY, R. L. Identification and recovery of *Leishmania* antigen displayed on the surface membrane of mouse peritoneal macrophages infected in vitro. **J. Immunol.**, **136**:1853-8, 1986.

WILLIAMS, J. E. *Leishmania* and *Trypanosoma*. In: **Medical Parasitology. A Practical Approach**. GILLESPIE, S. H.; HAWKEY, P. M. (Eds.). Oxford University Press, 1995.

WILSON, M. E.; YOUNG, B. M.; ANDERSEN, K. P.; WEINSTOCK, J. V.; METWALI, A.; ALI, K. M.; DONELSON, J. E. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. **Infect. Immun.**, **63**:2062-9, 1995.

XU, D.; MCSORLEY, S. J.; CHATFIELD, S. N.; DOUGAN, G.; LIEW, F. Y. Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-). **Immunology**, **85**:1-7, 1995.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, **48**:449-70, 1994.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M. Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **95 Suppl 1**:S27-58, 2001.