



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*LEISHAMANIA CHAGASI* - PADRONIZAÇÃO DE
REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS VISANDO A
QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS**

MANOEL LEÔNCIO DA PENHA FILHO

**Salvador - Bahia - Brasil
2003**

93.161



001717

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

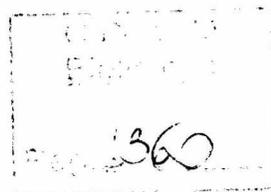
**ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*LEISHMANIA CHAGASI* -PADRONIZAÇÃO DE
REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS VISANDO A
QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS**

Manoel Leôncio da Penha Filho

Orientador: Lain Carlos Pontes de Carvalho

Co-orientadora: Neuza Maria Alcântara Neves

**Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre em
Patologia Experimental.**



**Salvador – Bahia – Brasil
2003**

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

Penha Filho, Manoel Leôncio da
P399 Anticorpos monoclonais anti-*Leishmania chagasi* – padronização de
reação imunohistoquímica e produção de anticorpos visando a
quantificação de antígenos / Manoel Leôncio da Penha Filho. -
Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia / Centro de
Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ, 2003.
109 f. : il. tab.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)- Universidade
Federal da Bahia, 2003.

1. Imunohistoquímica. 2. Anticorpos monoclonais 3. ELISA. 4. *Leishmania chagasi*. I. Título.

CDU 577.27:616.993.161

2100.11

ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-LEISHMANIA CHAGASI – PADRONIZAÇÃO DE REAÇÃO
IMUNOHISTOQUÍMICA E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS VISANDO A QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS

MANOEL LEÔNCIO DA PENHA FILHO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



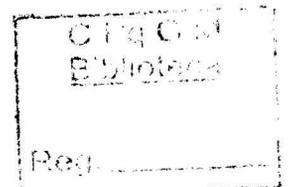
Dra. Sílvia Inês Sardi
Professora Adjunta
UFBA



Dr. José Orivaldo Mengele Júnior
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

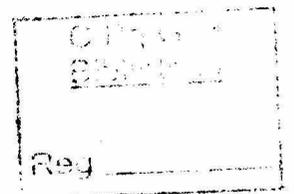


FONTES DE FINANCIAMENTO:

BIOMANGUINHOS

CNPq

*Dedico esta dissertação ao Deus em
que creio e a minha mãe, pela
paciência nos momentos de minha
ausência.*



AGRADECIMENTOS

Especialmente, ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho e a Dr^a Neuza M^a Alcântara Neves pela orientação, pela oportunidade e pela perseverança em todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. Geraldo Gileno, pelas contribuições principalmente nas etapas envolvendo técnicas de biologia molecular.

Ao Dr. Washington Luís Conrado dos Santos, pelas orientações principalmente nos momentos em que foram necessários conhecimentos de biologia celular e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

A doutoranda Márcia Teixeira, pela atenção e colaboração em incontáveis etapas deste estudo.

A Dra Tânia M^a Correia Silva, pela valiosa contribuição na padronização dos ensaios de imunohistoquímica.

A Dr^a Bernadete Miranda dos Santos, pela competência e compreensão nos momentos mais difíceis quando orientadora de iniciação científica.

A Dr^a Márcia Marinho pelo primeiro estímulo à busca do conhecimento científico.

As bibliotecárias do CPqGM Fiscina, Christina, e Vânia, assim como Edith, Zinha e Marcela pelas valiosas contribuições na busca de referências bibliográficas e na normatização desta dissertação.

A Rosália, Iumara e Rose pela disposição em resolver as questões acadêmicas.

Às todos que compõem os laboratórios CHAGAS, LAPEX, LASP, LIF, LPBC e LPBM.

A Adriana Marques Fróes e a Elivani Sacramento de Jesus, pela paciência e dedicação durante os momentos em que trabalhamos juntos.

Aos amigos Adriano, Ana Lúcia, Anselmo, Antonedson, Carla, Carol, Cláudia, Daniel, Everaldo, Djalma, Flávia, Flávia Helena, Juliana, Lia, Lenita, Liliana, Marcelo, Márcio, Marco, Marcos, Marta, Mauricio, Micely, Miriam, Nathanael, Dr^a Neci, Patricia, Paulo, Paola, Pedro, Rejane, Ricardo, Roberto, Tatiana, Sérgio, Stella, Tiana pelos momentos de seriedade e de descontração durante todo o tempo em que trabalhei no LIMC e LPBC, e a Daniela, pela amizade enquanto colega de pós-graduação.

Ao funcionários da ADAB, sobretudo aqueles da Coordenadoria de Feira de Santana e aos diretores, Drs. Luciano J. C. Figueirêdo e Lourival F. de Oliveira, por entenderem a importância de uma boa qualificação profissional.

A todos aqueles, que mesmo não citados, participaram deste trabalho.

RESUMO

ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-*LEISHMANIA CHAGASI* – PADRONIZAÇÃO DE REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA E PRODUÇÃO DE NOVOS ANTICORPOS VISANDO A QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS. MANOEL LEÔNCIO DA PENHA FILHO. [INTRODUÇÃO] O diagnóstico de certeza da leishmaniose visceral (LV) só é conseguido através da demonstração do parasito diretamente ou em cultura o que implica em procedimentos demorados envolvendo certo risco e/ou dor. Este estudo tem como objetivos a produção de AcMc anti-*Leishmania chagasi*, padronização de um ensaio de imunohistoquímica para visualização de amastigotas de *Leishmania* utilizando AcMc e verificação do potencial de um ELISA de inibição utilizando AcMc em quantificar amastigotas de *Leishmania*. [MATERIAIS E MÉTODOS] Camundongos BALB/c foram imunizados com antígeno de amastigotas de *L. chagasi* ou com a proteína recombinante Lc-13 cujo gene foi clonado de uma biblioteca de cDNA de *L. chagasi*. Os esplenócitos destes animais foram fundidos com células SP 2-0 através de polietilenoglicol. Estes, juntamente com um AcMc já disponível, o 5A9H8, foram usados em um ensaio de imunohistoquímica utilizando fígado de hamster infectado com *L. chagasi* parafinado fixado em formalina, testando-se diferentes protocolos de exposição de epitopos. Também com os mesmos AcMc foi realizado um ELISA de inibição a fim de quantificar amastigotas de *Leishmania*. [RESULTADOS] Foram encontrados dois clones reativos em cada fusão; o 10B4/6 e o 10D8 na primeira e o 2C10D5 e o 11E8H7 na segunda. Os AcMc 10B4/6 e o 10D8 são ambos IgG1, reconhecem antígenos com peso molecular entre 47 e 57 kDa e são possivelmente idênticos. Foi encontrada marcação de amastigotas, em tecidos infectados, com os seguintes AcMc: 5A9H8, em seções pré-tratadas com calor, e o 10B4/6 e o 10D8, em seções pré-tratadas com pronase. No ELISA de inibição o AcMc 5A9H8 mostrou-se capaz de detectar no mínimo 10^5 parasitos por poço de placa de microtitulação. [PALAVRAS CHAVE] Imunohistoquímica. Anticorpos Monoclonais. ELISA. *Leishmania chagasi*.

ABSTRACT

MONOCLONAL ANTI-*LEISHMANIA CHAGASI* ANTIBODIES – STANDARDIZATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL REACTIONS AND PRODUCTION OF NEW ANTIBODIES AIMING AT ANTIGEN QUANTIFICATION. MANOEL LEÔNICIO DA PENHA FILHO [INTRODUCTION] The certainty of diagnosis in visceral leishmaniasis is only achieved through the direct demonstration of parasites in culture, implying in long procedures and in risks and/or pain for the patients. The objectives of this study is the production of anti-*Leishmania chagasi* monoclonal antibodies (mAb), standardization of an immunohistochemical assay for allowing the visualization of *Leishmania* amastigotes using the mAb, and finding out the potential of a mAb-based inhibition ELISA for quantifying *Leishmania* amastigotes. **[MATERIAL & METHODS]** BALB/c mice were immunized with *L. chagasi* amastigote antigens or with a recombinant protein denominated Lc13, the gene of which was cloned from a *L. chagasi* amastigote cDNA library. Splenocytes from these animals were obtained and fused with SP 2-0 myeloma cells by using polyethylene glycol. The mAb produced by the hybrid cells, together with an available mAb (5A9H8), were used in an immunohistochemical assay, using paraffin sections of infected hamster liver. Different protocols for the exposition of epitopes were evaluated. One of the mAb was also used in an inhibition ELISA to quantify *Leishmania* amastigotes. **[RESULTS]** Two anti-amastigote mAb-producing clones were obtained in each fusion, the 10B4/6 and the 10D8 mAb in the first and the 2C10D5 and the 11E8H7 mAb in the second. The 10B4/6 and the 10D8 mAb, obtained from the fusion of myeloma with splenocytes of an animal immunized with lysed amastigotes, were both IgG1, recognized the same antigens, with molecular weights ranging from 47 to 57 kDa, and were possibly identical. o 10B4/6 e o 10D8 na primeira e o 2C10D5 e o 11E8H7 na segunda. The following mAb stained amastigotes in infected tissues in an immunoperoxidase reaction: the 5A9H8, using heat-treated sections, and the 10B4/6 and the 10D8, in pronase-treated sections. The 5A9H8 mAb detected a minimum of 10^5 parasites per well in the inhibition ELISA. **[KEY WORDS]** Immunohistochemistry. Monoclonal antibodies. ELISA. *Leishmania chagasi*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Análise da expressão e semipurificação de Lc-13 através de gel de 61 poliacrilamida
- Figura 2.** Reatividade dos soros dos camundongos imunizados com antígenos 63 ou promastigotas vivos de *L. chagasi* em ELISA
- Figura 3.** Reatividade dos soros dos camundongos imunizados com Lc-13 em 64 ELISA
- Figura 4.** Modelo de sensibilização de placa de ELISA usada no *screening* dos 66 AcMc anti-Lc-13
- Figura 5.** Reação dos anticorpos monoclonais anti-Lc-13 contra Lc-13 em 67 membranas
- Figura 6.** Reação dos anticorpos monoclonais anti-*L. chagasi* contra antígeno 69 solúvel de amastigotas de *L. chagasi* em membranas
- Figura 7.** Reação dos anticorpos monoclonais contra antígeno bruto de 70 amastigotas de *L. chagasi* em membranas
- Figura 8.** Reação dos anticorpos monoclonais contra antígeno bruto de 71 promastigotas de *L. chagasi* em membrana
- Quadro 1.** Identificação das subclasses e isotipos dos novos anticorpos 72 monoclonais produzidos e do 5A9H2(H8)
- Figura 9.** ELISA de inibição com o anticorpo monoclonal 5A9H8(H2) 74
- Figura 10.** Imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal 5A9H8(H2) 76
- Figura 11.** Imunohistoquímica com os anticorpos monoclonais 10B4/6 e 10D8 77

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMc	Anticorpos monoclonais
BSA	Soroalbumina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
EDTA	Ácido etileno diamino-tetracético
ELISA	Enzime-linked immunosorbent assay
gp 63	Glicoproteína de 63 kDa
HAT	Hipoxantina , aminopterin, timidina
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LDA	Teste de diluição limitante
LV	Leishmaniose Visceral
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NH	Hidrolase Nuceosídeo
NK	Natural killer
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenileno-diamino

PBS	Solução salina fosfatada, pH 7.2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenil-metil-sulfônico; inibidor enzimático
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
T20	Tween 20
Th1	Linfócitos T helper do tipo 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
<u>1.1 Aspectos Gerais</u>	15
<u>1.2 A Leishmaniose Visceral</u>	19
<u>1.3 A Leishmaniose Canina</u>	21
<u>1.4 Resposta Do Hospedeiro E Imunidade À <i>Leishmania</i></u>	23
<u>1.5 Anticorpos Monoclonais E As Leishmanioses</u>	26
<u>1.6 Detecção De Leishmanias Através De Imunohistoquímica</u>	31
<u>1.7 Quantificação De Antígenos De <i>Leishmania</i></u>	34
2 OBJETIVOS	40
<u>2.1 Objetivo Geral</u>	40
<u>2.2 Objetivos Específicos</u>	40
3 JUSTIFICATIVA	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
<u>4.1 Obtenção Do Antígeno Recombinante Lc-13</u>	43
4.1.1 Produção em massa das bactérias <i>E. coli</i> TOP 10F'-Lc-13 e TOP 10F'-PBKCMV sem inserto	43
4.1.2 Semipurificação de Lc-13	44
4.1.3 Dosagem de proteínas	45
<u>4.2 Obtenção de Amastigotas de <i>L. chagasi</i> Purificadas</u>	45
4.2.1 Obtenção de promastigotas de <i>L. chagasi</i>	45
4.2.2 Infecção de hamsters com <i>L. chagasi</i>	46
4.2.3 Purificação de amastigotas de baço de hamsters	47
<u>4.3 Preparo De Antígenos De <i>L. chagasi</i></u>	47
4.3.1 Antígenos de amastigotas	47
<u>4.4 Imunização De Camundongos</u>	48
4.4.1 Animais	48
4.4.2 Imunização com antígeno de amastigotas de <i>L. chagasi</i>	48
4.4.3 Imunização através de infecção com promastigotas vivos de <i>L. chagasi</i>	48
4.4.4 Imunização com o antígeno recombinante Lc-13	49
<u>4.5 Eficácia Das Imunizações</u>	49
<u>4.6 Produção De Anticorpos Monoclonais</u>	50
4.6.1 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos (PEC)	50
4.6.2 Preparo de células do mieloma SP2-0	51
4.6.3 Preparo de esplenócitos	52
4.6.4 Fusão celular	53
4.6.5 Seleção dos hibridomas (ELISA)	54
4.7 Eletroforese Em Gel De Poliacrilamida Na Presença De Duodecil Sulfato De Sódio (SDS-PAGE) E <i>Western Blot</i>	54

<u>4.8 Análise Das Subclasses E Isotipos De Imunoglobulinas Dos AcMc</u>	56
<u>4.9 Semipurificação De Imunoglobulinas Através De Precipitação Em Sulfato De Amônio (NH₄)₂SO₄</u>	57
<u>4.10 Quantificação De Amastigotas De <i>Leishmania</i> Com AcMc Através De Um ELISA De Inibição</u>	58
4.10.1 Quantificação De Antígenos Usando Um AcMc	58
4.10.2 Quantificação de antígenos usando vários AcMc	58
<u>4.11 Imunohistoquímica Para Identificação De Amastigotas de <i>L. chagasi</i></u>	59
5 RESULTADOS	62
<u>5.1 Obtenção Do Antígeno Recombinante Lc-13</u>	62
<u>5.2 Semipurificação Do Antígeno Recombinante Lc-13</u>	62
<u>5.3 Purificação De Amastigotas De Baço De Hamsters</u>	64
<u>5.4 Imunização De Camundongos</u>	64
<u>5.5 Híbridomas Produzidos</u>	65
<u>5.6 Caracterização Dos Pesos Moleculares Dos Antígenos Reconhecidos Pelos AcMc</u>	68
<u>5.7 Determinação Dos Isotipos De Imunoglobulinas Dos AcMc</u>	72
<u>5.8 ELISA De Inibição Para Quantificação De Amastigotas De <i>Leishmania</i></u>	73
<u>5.9 Imunohistoquímica Para Identificação De Amastigotas de <i>L. chagasi</i></u>	75
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÃO	84
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO A – Manuscrito para publicação	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Filo-Protozoa: Ordem-Kinetoplastida: Família-Trypanosomatidae) que possuem dois diferentes hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado (LAINSON, 1978). Estes parasitos foram denominados assim em homenagem a W.B. Leishman, que observou as primeiras “leishmanias”, em 1901 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

A *Leishmania* pode ser encontrada nas formas amastigota e promastigota, que são morfológica e biologicamente semelhantes nas diversas espécies já descritas (LAINSON; SHAW, 1987). Os promastigotas são as formas encontradas no trato digestivo do vetor invertebrado (flebotomíneo) e são flagelados. Já os amastigotas, encontram-se no hospedeiro vertebrado e se apresentam com morfologia ovalada (SACKS; PERKINS, 1984).

A transformação de promastigotas para amastigotas ocorre no fagolisossomo dos macrófagos. Esta transformação é necessária para a sobrevivência do parasito no hospedeiro (THIE; BRUCHHAUS, 2001).

Geralmente, há uma boa relação entre o parasito e o hospedeiro em condições naturais e aquele pode ser encontrado em macrófagos da pele, de vísceras ou no sangue. Entretanto, em hospedeiros não usuais, como o homem, pode haver uma forte reação do hospedeiro contra o parasito, que resulta em lesões de pele (leishmaniose cutânea e mucocutânea) ou em alterações de órgãos internos (calazar e outras formas de leishmaniose visceral) (LAINSON; SHAW, 1978).

Em todas as formas das leishmanioses, a presença das formas amastigotas

dentro das células do sistema fagocítico mononuclear é a principal característica parasitológica da doença (HEPBURN, 2000).

Os vetores das leishmanioses fazem parte do grupo dos flebotomíneos, que são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (YOUNG; DUNCAN, 1994). Os principais gêneros envolvidos são o *Phlebotomus* (Velho Mundo) e a *Lutzomia* (Novo Mundo) (FORATTINI, 1973).

A infecção ocorre quando as fêmeas do inseto vetor, exercendo a hematofagia, inoculam as formas promastigotas metacíclicas infectantes no tecido subcutâneo dos hospedeiros mamíferos, sendo estas formas então fagocitadas pelos macrófagos.

As leishmanioses são endêmicas em 88 países (66 no Velho Mundo e 22 no Novo Mundo) com uma incidência anual estimada em 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 casos de leishmaniose visceral. A população exposta é estimada em 350 milhões de pessoas, com uma prevalência de 12 milhões (DESJEUX, 1996). Estão espalhadas por todos os continentes, exceto a Antártida e a Austrália (BAÑULS et al., 1999).

Podem ser observados diversos fatores de risco para a ocorrência das leishmanioses, como imunodeficiências, mal-nutrição, desestruturação dos serviços de saúde, urbanização desordenada, desflorestamento, domesticação do ciclo de transmissão, migração de áreas rurais para as urbanas, fatores sócio-econômicos e culturais (DESJEUX, 2001). Qualquer mudança nos fatores ambientais pode levar, como consequência, a uma alteração na distribuição dos parasitos (ASHFORD, 2000).

Há um risco mundial de ressurgimento das leishmanioses, não somente devido ao surgimento de novos fatores de risco, mas também por causa de um

súbito e significativo aumento dos pré-existentes. Uma coordenação multidisciplinar entre os setores de saúde e outros setores governamentais, como os responsáveis pela educação, agricultura, água, florestas e outras áreas naturais, também é crucial para a prevenção e controle dos maiores fatores de risco (DESJEUX, 2001).

Teoricamente, o controle das leishmanioses poderia ser feito através da interrupção do ciclo de transmissão. O principal problema é que, no novo mundo, as leishmanioses são doenças zoonóticas que são mantidas em ciclos naturais, envolvendo animais selvagens e insetos. Quatro medidas podem ser tomadas para diminuir o sucesso das infecções por parasitos do gênero *Leishmania*: controle do vetor, eliminação dos hospedeiros reservatórios, diagnóstico e tratamento dos casos humanos e proteção pessoal (GRIMALDI, 1993).

Este grupo de doenças, tem ressurgido como infecções oportunistas em pacientes acometidos pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), em diversas partes do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1991).

As doenças causadas pelo gênero *Leishmania* são agrupadas em quatro entidades eco-epidemiológicas: as leishmanioses viscerais antroponótica e zoonótica, e as leishmanioses cutâneas antroponótica e zoonótica. Nas formas antroponóticas, o ser humano é considerado como a principal fonte de infecção para o vetor; já no ciclo de transmissão zoonótico, os animais são os reservatórios que mantêm e disseminam os parasitos (DESJEUX, 2001).

A gravidade da infecção por *Leishmania* em seres humanos depende da resposta imune do hospedeiro e da virulência do parasito (CERF et al., 1987; PEARSON et al. 1996). Este gênero de protozoário é capaz de produzir um largo espectro de doenças, desde infecções assintomáticas até formas desfigurativas de

leishmanioses cutâneas ou formas viscerais potencialmente fatais (calazar) (GRIMALDI; TESH, 1993; LAINSON; SHAW, 1987).

Assim, podem ser observadas úlceras cutâneas (leishmaniose cutânea devido as espécies de *Leishmania tropica* e o complexo *L. mexicana*), lesões mutilantes das mucosas faringea e oro-nasal (leishmaniose mucocutânea devido a *L. braziliensis*) e infecções viscerais fatais (leishmanioses viscerais devido as espécies do complexo *L. donovani*). As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial da Saúde como uma das seis principais doenças tropicais dos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Não se sabe como a *Leishmania* causa as leishmanioses pois, aparentemente, estão envolvidos múltiplos fatores inerentes ao próprio parasito (CHANG; MCGWIRE, 2002). Também não se tem conhecimento porque a *L. major*, por exemplo, geralmente causa lesões cutâneas, permanecendo no local da inoculação (doença cutânea), enquanto a *L. donovani* migra para a maior parte do sistema fagocítico-mononuclear (leishmaniose visceral) e a *L. braziliensis*, produz em alguns pacientes, uma doença mucosa (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; HEPBURN, 2000).

1.2 A LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral (LV) também conhecida como calazar, é uma protozoose sistêmica grave, cuja letalidade pode atingir cerca de 10 % dos casos, quando não se institui um tratamento adequado. Antes considerada como uma endemia focal de áreas rurais e pobres, sua distribuição geográfica vem se modificando consideravelmente desde os meados dos anos 80, quando se observou claramente sua expansão para outras regiões rurais até então indenes e para a

periferia de alguns centros urbanos (BRASIL, 2003).

Mais de 90 % dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). No processo de urbanização, onde os migrantes foram marginalizados na periferia das cidades, em áreas sem condições de moradia adequada, a presença dos flebótomos e a circulação de cães infectados, oriundos das áreas endêmicas, propiciaram a adaptação da *Leishmania* ao novo nicho ecológico (BRASIL, 2003). Desta forma, foi observado que nas últimas décadas houve um grande aumento de transmissão urbana da LV americana em muitas cidades brasileiras (WERNECK, 2002).

Os agentes etiológicos envolvidos são as espécies do complexo *Leishmania donovani* (LAINSON; SHAW, 1987): *L. donovani* (Velho Mundo), *L. infantum* (Velho Mundo) e *L. chagasi* (Novo Mundo). É aceitável a sinonímia entre *L. chagasi* e *L. infantum* (GRIMALDI; TESH, 1993; MOMEN et al., 1987; RIOUX et al., 1990).

Há suspeitas que a *L. infantum* veio para a América do Sul em cães que acompanharam os primeiros conquistadores (KILLICK-KENDRICK, 1980).

Diversas são as denominações dadas à leishmaniose visceral, sendo que no Brasil é adotado o termo calazar. Também é conhecida como anemia esplênica infantil e leishmaniose esplênica infantil, na Europa (ALENCAR, 1978). Os indianos usavam inicialmente o termo *kala-azar* mas depois passaram a denominar a doença como leishmaniose visceral (ZIJLSTRA; EL-HASSAN, 2001).

Para o diagnóstico da leishmaniose visceral, são utilizadas combinações de algumas metodologias: a) suspeita clínica (febre, caquexia e hepatoesplenomegalia); b) detecção microscópica de amastigotas de *Leishmania* em esfregaços provenientes de punções de linfonodo, medula óssea ou baço; c) cultura dos parasitos de qualquer uma das amostras citadas; d) testes sorológicos para a

detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. O achado dos parasitos é considerado o padrão ouro para diagnóstico, mas a metodologia empregada é invasiva, pouco sensível e difícil de ser realizada em condições de campo. Os testes sorológicos tem um importante papel no diagnóstico da LV, mas existem vários problemas, como a negatividade em alguns pacientes, a reação cruzada com outros patógenos, incluindo as diferentes espécies de *Leishmania*. Além disso, a maioria deles não consegue fazer distinção entre infecções ativas, subclínicas e passadas (HOMMEL, 1997).

Dentre os hospedeiros vertebrados, existe um grande número de mamíferos: roedores, canídeos, marsupiais, edentados, ungulados e primatas, que são reservatórios do parasito para os flebotomíneos (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Ainda não é claro o papel dos reservatórios atualmente incriminados na epidemiologia da leishmaniose visceral (CERQUEIRA, 2001), entretanto, as principais suspeitas ainda recaem sobre a família *Canidae*. Acreditamos que os cães domésticos constituem o principal reservatório de *L. infantum* e *L. chagasi*, e têm um importante papel na transmissão da infecção para os seres humanos (MORENO; ALVAR, 2002).

Os dados sorológicos dos cães oriundos dos países do oeste do Mediterrâneo sugerem que de 15 milhões de cães, 2,5 milhões estão infectados (16,7 %) (MORENO; ALVAR, 2002). As maiores soroprevalências foram relatadas na América do Sul, com aproximadamente 33 % dos cães infectados em uma região da Venezuela (ZERPA et al., 2000), e 36 % em Jacobina, no estado da Bahia (ASHFORD et al., 1998)

Contudo, atualmente, tem-se observado uma falta de correlação entre a doença em cães e em seres humanos, o que levanta suspeitas a respeito da

participação de outros reservatórios (ASHFORD, 1992; CUNHA et al., 1995; DIETZE et al., 1997; PARANHOS-SILVA et al., 1996).

1.3 A LEISHMANIOSE CANINA

A leishmaniose canina é uma doença sistêmica severa de cães causada pela *Leishmania*. Entretanto, cães infectados por *Leishmania* através da picadura de insetos nem sempre desenvolvem a doença. Em alguns indivíduos, há uma resposta imune celular protetora, que controla a infecção. Em outros, instala-se uma doença progressiva e severa que se desenvolve lentamente. Os aspectos clínicos variam muito. Os cães afetados geralmente aparecem com um ou mais de nove sinais clínicos: a) lesões cutâneas, b) emagrecimento e perda de apetite, c) linfadenopatia local ou generalizada, d) lesões oculares, e) epistaxe, f) coxeadura, g) anemia, h) falha renal ou i) diarreia. A temperatura corpórea pode flutuar, mas é usualmente normal ou subfebril. O diagnóstico pode ser extremamente difícil, somente vindo a ser confirmado depois de um exame físico combinado com técnicas de diagnóstico parasitológicas, sorológicas e/ou moleculares (FERRER, 1999). Dentre os sinais clínicos, também é observada a onicogribose.

O tratamento da leishmaniose visceral canina possui baixa eficácia. A maioria dos cães tratados conseguem resolver, transitoriamente, a doença clínica, mas não conseguem ficar livres dos parasitos (ALVAR et al., 1994).

O sacrifício geralmente não é aceito, por questões éticas e/ou sociais (MORENO; ALVAR, 2002).

Os mecanismos de proteção e susceptibilidade à leishmaniose canina não são totalmente conhecidos (PINELLI et al., 1994).

A infecção, tanto de seres humanos como de cães por *L. Infantum*, é caracterizada por uma ausência de resposta imune celular aos antígenos parasitários. O cão pode vir a servir de modelo para a LV humana, mas há poucos estudos relacionados com a resposta imune nas leishmanioses caninas, e estes foram realizados principalmente em cães naturalmente infectados, pois estudos da resposta imune de cães infectados experimentalmente são ainda limitados (RUITENBERG et al., 2001).

As formas de transmissão da leishmaniose visceral em cães não são totalmente claras. Existem espécies de flebotomíneos em diversas áreas da América do Norte onde já foi detectada LV canina, entretanto a transmissão através do vetor ainda não foi demonstrada e algumas características epidemiológicas de infecção não suportam a hipótese de transmissão através de um vetor. Há ainda a possibilidade de haver transmissão direta entre os cães (SCHANTZ et al., 2001).

1.4 RESPOSTA DO HOSPEDEIRO E IMUNIDADE À *Leishmania*

O insucesso do hospedeiro vertebrado em controlar a infecção por *Leishmania* é aparentemente devido a dois fatores: a) a facilidade com que algumas amostras de *Leishmania spp.* resistem aos efeitos microbicidas dos macrófagos ativados (GRIMALDI, 1993) e b) a ineficiência de alguns indivíduos em montar uma resposta imune celular protetora.

Para o estabelecimento de uma infecção no hospedeiro mamífero, a *Leishmania* tem que sobreviver ao processo de fagocitose e depois resistir ao ambiente ácido e rico em proteases do fagolisossomo. Diversas famílias de moléculas são diferencialmente expressas na superfície de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e contribuem para a sobrevivência intrafagossomal e

intrafagolisossomal (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998). A gp 63 é considerada um dos maiores fatores de virulência e foi selecionada como candidata a vacina (VICTOIR; DUJARDIN, 2002).

Durante a fase crônica, alguns amastigotas intracelulares são mortos ou lisados devido, talvez, a uma incompleta proteção conferida por seus determinantes invasivos/evasivos. Estes determinantes são considerados como os principais geradores do fenótipo virulento, apesar da existência de outros fatores ligados ao vetor e ao hospedeiro (CHANG; MCGWIRE, 2002). Este é um modelo aplicável a outras infecções crônicas causadas por patógenos não toxigênicos (CHANG; MCGWIRE, 2002).

Não se sabe ainda, com segurança, como a *Leishmania* evade as defesas imunológicas e persiste por longo tempo em hospedeiros imunocompetentes (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998).

Já foram demonstrados grande número de efeitos mediados por anticorpos contra a infecção por *Leishmania*, mas a imunidade celular é considerada a principal resposta imune protetora nas leishmanioses (GRIMALDI, 1993).

IFN- γ produzido por células Th1 CD4+, e a subsequente ativação de macrófagos para destruir os amastigotas intracelulares, é o principal meio que o hospedeiro dispõe para o controle da infecção (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998). A *Leishmania* é capaz de interferir em várias destas etapas, podendo diminuir ou até bloquear o desenvolvimento de uma resposta imune protetora, inclusive modulando a produção de citocinas e a apresentação de antígenos pelos macrófagos (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; BOGDAN et al., 1996).

Para a formação de uma resposta imune protetora contra a *Leishmania* é necessária uma ativação efetiva de células NK, a apresentação de antígenos

protetores, a indução e a expansão de células Th1 CD4⁺ e a ativação de macrófagos via IFN- γ para matar os parasitos por NO (BOGDAN et al., 1996).

A IL-12 parece proporcionar proteção, não somente pela indução de IFN- γ , mas também pela supressão de IL-4 e da resposta Th2. As potentes e diretas funções de IL-12 a torna uma citocina candidata para ser aplicada no momento da infecção, a fim de obter uma ação terapêutica (BOGDAN et al., 1996).

A supressão da produção de IL-12 por espécies de *Leishmania* visceralizantes (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*) pode contribuir para a imunodeficiência específica observada durante a fase aguda da leishmaniose visceral em seres humanos e para a ausência de detecção de IFN- γ no granuloma hepático, como observado em camundongos infectados por *L. chagasi* (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998).

Linfócitos CD8⁺ também parecem ser importantes nos mecanismos imunológicos responsáveis pela cura das leishmanioses murinas causadas por *L. major*, *L. amazonensis* e *L. donovani*. Células CD8⁺ antígeno-específicas ativadas tem sido mostradas como produtoras de IFN- γ e podem ter um efeito citolítico sobre macrófagos parasitados (COUTINHO, 1998).

A saliva do *Phlebotomus papatasi* contém um fator que exacerba a leishmaniose. A saliva não eleva diretamente o número de leishmanias, mas inibe a capacidade dos macrófagos ativados por IFN- γ de destruírem os parasitos intracelulares (HALL; TITUS, 1995).

A diversidade de resposta dos indivíduos dentro de uma mesma população frente aos diversos patógenos permanece sem explicação. Entretanto, determinantes genéticos contribuem substancialmente para o avanço das infecções. Este paradigma, onde a *Leishmania* está envolvida, revela como contribuições

genéticas específicas ao hospedeiro podem levar à susceptibilidade (LOCKSLEY et al., 1999).

A *Leishmania* pode ter desenvolvido mecanismos para gerar um grande repertório de genótipos necessários para assegurar o sucesso do parasito nos diversos ambientes (VICTOIR; DUJARDIN, 2002).

1.5 ANTICORPOS MONOCLONAIS E AS LEISHMANIOSES

A produção de hibridomas é uma das mais importantes tecnologias no laboratório biomédico (GEUS; HENDRIKSEN, 1998), constituindo-se em uma fonte contínua de anticorpos monoclonais (AcMc) com características definidas e total homogeneidade (COOK; SELF, 1995).

Os AcMc são ferramentas importantes no laboratório e na clínica médica, como agentes terapêuticos, componentes de kits para imunoenaios, reagentes para cromatografia de afinidade e carreadores em terapias do tipo droga-alvo e identificadores de moléculas e células (GEUS; HENDRIKS, 1998).

A maior vantagem dos AcMc é sua alta especificidade, que pode ser usada tanto para a detecção quanto para a caracterização da função e estrutura de proteínas (BRUCE, 2002; COOK; SELF, 1995; LADYMAN, 1995). As preparações puras de AcMc podem ser usadas para aplicações de alta sensibilidade. Desta forma, pode-se aumentar a precisão dos testes. Também são reagentes com boa estabilidade e que proporcionam ensaios reprodutivos (COOK; SELF, 1995). Há ainda o potencial de transformá-los, em nível genético para um fim particular, como aplicações em diagnóstico e terapêutica. Isto inclui a possibilidade de mudar a especificidade antigênica do anticorpo e sua constante de dissociação (COOK; SELF, 1995).

Uma alta sensibilidade também é requerida quando se busca moléculas que não são passíveis de detecção por outros métodos, ou quando se obtém apenas pequenos volumes de amostra, ou quando esta é pouco concentrada, como as obtidas em métodos pouco invasivos (urina e saliva, por exemplo) (COOK; SELF, 1995).

Em ensaios de competição, a concentração dos reagentes utilizados necessita ser precisamente controlada. Nestes ensaios há uma forte associação entre a quantidade reduzida do elemento marcado e o aumento da sensibilidade (COOK; SELF, 1995).

Antígenos de *L. donovani* foram identificados com sucesso no soro de pacientes com calazar com uso de AcMc. Não houve reação falso-positiva ou cruzada com soro de indivíduos normais ou com soro de pacientes com outras doenças. O teste usado utilizou pequena quantidade de amostra e mostrou-se muito sensível, muito específico, com resultados consistentes e com baixo custo (HU, 1988).

Um AcMc foi altamente específico para amostras de *L.(L.) venezuelensis* testadas por imunofluorescência, que pode ser padronizada utilizando-se poucos parasitos (HANHAM, 1990).

A produção de anticorpos policlonais de qualidade depende de imunógenos puros, o que não é estritamente necessário para os anticorpos monoclonais (HAAHEIM, 1991), porque a especificidade destes é determinada no processo de clonagem (LADYMAN; RITTER, 1995). As células produtoras de anticorpos monoclonais podem ser estocadas indefinidamente em nitrogênio líquido, enquanto para a produção dos policlonais é necessário imunizar novos animais (HAAHEIM, 1991), nem sempre com grande reprodutibilidade.

A taxonomia da *Leishmania* pode ser realizada através de anticorpos monoclonais, além de através da caracterização de isoenzimas, hibridização com DNA de cinetoplasto e ensaios utilizando enzimas de restrição (DUSANIC, 1988). Utilizando-se de grande número de isolados de seres humanos, mamíferos selvagens e vetores invertebrados, confirmou-se a alta especificidade dos AcMc quando da identificação de espécies de *Leishmania* (CANTO-LARA, dados não publicados; GRIMALDI et al., 1989;).

Ensaio de caracterização de DNA podem distinguir bem entre os gêneros de *Leishmania*, em nível de subgêneros, mas a identificação de espécies usando estes métodos tem, em geral, se mostrado difíceis, devido a falta de especificidade. Já a caracterização de isoenzimas é um excelente método para distinguir diferentes espécies de *Leishmania*, mas é requerida grande quantidade de parasitos. Outros métodos de identificação também requerem grande quantidade destes (HANHAM, 1990). Técnicas bioquímicas não são adaptadas para a tipagem de rotina das espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. É necessário, em geral, o cultivo de grandes quantidades de parasitos *in vitro*, que pode ser difícil de obter (JAFFE et al., 1984).

AcMc, produzidos a partir de camundongos imunizados com membranas de promastigotas, reagiram somente com determinantes presentes em *L. donovani*, não havendo reações cruzadas com qualquer outra espécie de *Leishmania* ou com membranas de *Trypanosoma cruzi*. Estes AcMc também conseguiram diferenciar *L. chagasi* de *L. donovani*, o que os testes bioquímicos e imunológicos não haviam conseguido (JAFFE et al., 1984).

AcMc produzidos contra *L. tropica* não mostraram reação cruzada significativa com *L. donovani*, *L. braziliensis* e *T. cruzi*. Também foram produzidos AcMc que são

estágio específicos de *Leishmania* (JAFFE, 1983).

AcMc são usados como ferramentas para identificação e purificação de uma variedade de antígenos (OLSON et al., 1989). Eles foram usados para identificar antígenos de superfície de subespécies e estudar a interação dos parasitos com as células hospedeiras. Um antígeno comum de amastigotas e promastigotas de *L. major* foi purificado através de um AcMc produzido contra *L. major* (KHABIRI et al., 2002). Há um grande potencial na obtenção de proteínas espécie-específicas purificadas para o uso como preparações padronizadas de antígenos altamente específicas. Juntamente com os AcMc, estas proteínas podem servir como ferramentas úteis no desenvolvimento de testes sorológicos para o diagnóstico clínico de leishmaniose visceral e em estudos epidemiológicos (JAFFE et al., 1984).

Porque o antígeno bruto de *Leishmania* usado em testes sorodiagnósticos contém muitos componentes que reagem cruzadamente com antígenos de outros patógenos, não é difícil entender a quantidade de falsos-positivos encontrados quando usados, em ensaios para anticorpos anti-*Leishmania*, soros provenientes de regiões endêmicas para outra doenças tropicais endêmicas. A utilização de preparações antígeno-específicas que somente são reconhecidas por soros de pacientes com calazar poderia aumentar a segurança e a reprodutibilidade dos testes sorodiagnósticos. Por conseguinte, poderiam ser produzidos antígenos padronizados que simplificariam a interpretação de resultados (JAFFE et al., 1984). Estes antígenos poderiam ser produzidos por engenharia genética em que os clones de bactérias contendo os genes os codificando seriam selecionados pelos anticorpos monoclonais relevantes.

Um ELISA usando anticorpos monoclonais foi capaz de detectar antígeno solúvel de *Penicillium marneffe*, tanto no soro como na urina de pacientes com

cultura positiva para este fungo, sendo altamente específico e sensível (PANICHAKUL et al., 2002). Anticorpos monoclonais foram usados para detecção de antígenos circulantes de *Leishmania* em pacientes com calazar, em um ELISA de competição. O monoclonais reconheceram peptídeos seqüenciais aparentemente de uma forma mais eficiente que outros antígenos. É importante selecionar bons epitopos para detecção de antígenos e uma mistura de monoclonais específicos para diferentes epitopos poderia ser uma boa ferramenta para o diagnóstico em um ELISA de competição (SINHA et al., 1992).

AcMc foram usados na imunização passiva de camundongos, protegendo-os de infecção com *L. mexicana*. Pode ser importante identificar os antígenos reconhecidos por estes AcMc para o desenvolvimento de imunidade protetora contra esta *Leishmania* (ANDERSON, 1983).

Rapidez, sensibilidade e conveniência são as principais características para o desenvolvimento de métodos de detecção de anticorpo. Muito destes métodos têm AcMc (COOK; SELF, 1995).

A alta especificidade deve ser usada com cautela (COOK; SELF, 1995), já que algumas vezes ela implica em baixa sensibilidade. Resultados negativos com AcMc não provam a ausência do antígeno buscado. Além disso, a reação com AcMc pode, no mínimo em teoria, reconhecer mais de um determinante antigênico (GALFRE; MILSTEIN, 1981).

O tempo necessário para se obter um AcMc, se dispendo do imunógeno, varia em torno de três a seis meses (LADYMAN; RITTER, 1995).

A indução de ascite pela inoculação intraperitoneal de hibridomas proporciona a obtenção de altas concentrações de anticorpos, a um baixo custo por miligrama de anticorpo produzido (GEUS; HENDRIKSEN, 1998).

1.6 DETECÇÃO DE LEISHMANIAS ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

O diagnóstico definitivo da leishmaniose depende da identificação de amastigotas no tecido ou no isolamento de promastigotas em cultura. A identificação histopatológica é difícil e varia quanto à sensibilidade. O isolamento ou a visualização é considerado o “padrão-ouro”, mas não é um meio diagnóstico uniforme e nem sempre é viável. Além do mais, nem todas as espécies crescem bem em cultura ou em animais e os resultados são dependentes do laboratório e do laboratorista. Estes métodos consomem muito tempo e podem necessitar de semanas a meses antes de produzirem os resultados (KENNER et al., 1999).

WEIGLE e col., (1987) encontraram uma sensibilidade limitada quando foi usada a histopatologia somente. Provavelmente isto ocorreu devido a escassez de organismos ou o encolhimento/distorção das amastigotas durante a fixação.

A demonstração de parasitos inteiros, ou antígeno parasitário, em imunohistoquímica, é considerada diagnóstica (ISMAIL et al., 1997).

A pesquisa imunohistoquímica de material antigênico relacionado com a *Leishmania* resultou positiva em amostras de linfonodo, baço e cérebro de um paciente. Foram encontradas formas amastigotas e material antigênico particulado, inclusive na luz de vasos do sistema nervoso, comprovando que nas imunodeficiências o tecido nervoso também pode ser afetado. Também pode ser confirmado que a leishmaniose é uma enfermidade oportunística em pacientes infectados por HIV (RAMOS et al., 1994).

A sensibilidade e a especificidade foi maior para a imunohistoquímica (51%) do que para a coloração com H. & E. (42 %). Além do mais, os organismos puderam ser diagnosticados em objetivas de menor aumento (x 20-40), o que proporciona uma maior rapidez em relação a observação de cortes corados por H. & E., em que

a morfologia do parasito é melhor identificada com objetiva de imersão. Sem a presença de um profissional experiente, a visualização direta de amastigotas de *Leishmania* (núcleo com o cinetoplasto circundado por uma parede celular), pode não ser confiável. É sabido que biópsias provenientes de infecções com baixa carga parasitária são frequentemente pouco úteis para o diagnóstico. Com amostras contaminadas, os amastigotas são extremamente difíceis de distinguir dos debris celulares (KENNER et al., 1999).

Em imunohistoquímica, o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina) produz um precipitado relativamente volumoso, que resulta em uma camada difusa marrom, o que dá aos amastigotas uma aparência de serem maiores, se comparados com amastigotas corados por H. & E. (~3-5 μm em oposição a 2-4 μm , respectivamente). O *background* na imunohistoquímica é mínimo e os amastigotas foram facilmente identificados como discos marrom escuros dentro de histiócitos, quando se usou um AcMc (KENNER et al., 1999).

A detecção e a localização de amastigotas nas leishmanioses cutâneas e mucocutâneas é mais eficiente e mais sensível usando a imunoperoxidase, tanto em relação à histopatologia convencional, onde os cortes são corados com H. & E. e com o exame direto de "raspados de tecido" (SALINAS et al., 1989).

Neste último estudo, não foram observadas reações cruzadas do AcMc anti-*Leishmania* com *Sporothrix schenckii*, *Mycobacterium leprae* e *Histoplasma capsulatum*; entretanto, houve reação com *Paracoccidioides*. A especificidade demonstrada confirma que a imunoperoxidase é uma alternativa valiosa no diagnóstico diferencial entre doenças causadas por *Leishmania* e outros patógenos (SALINAS et al., 1989).

Em um estudo com pacientes portadores de leishmaniose tegumentar, a imunoperoxidase foi o método mais sensível para a detecção de amastigotas em lesões ativas do que o histopatológico tradicional, o imprint, a cultura e a imunofluorescência (SCHUBACH et al, 2001).

A técnica de imunoperoxidase indireta é simples de executar, livre de artefatos, reproduzível e pode também ser adaptada para estudos ultraestruturais (SALINAS et al., 1989; SELLS; BURTON, 1981). Uma reação de imunoperoxidase usando um AcMc específico em tecidos de pacientes com leishmaniose cutânea pós-calazar demonstrou ser uma técnica simples e mais sensível que os métodos parasitológicos convencionais (ISMAIL et al., 1997).

A técnica de imunoperoxidase é aplicável a tecidos fixados (KENNER et al., 1999). Há ainda a conveniência do uso de materiais fixados em formalina para estudos retrospectivos, e em usos clínicos, quando o diagnóstico não pode ser confirmado por coloração com Giemsa ou cultura de tecidos (SELLS; BURTON, 1981). Existe também a possibilidade do uso de outros fixadores, como o etanol, quando se obtém padrões de coloração similares aos observados com os tecidos criopreservados (AHRAM et al., 2003; GILLESPIE et al., 2002).

O método também é útil no laboratório como uma ferramenta para acompanhar a distribuição e o destino de um determinado antígeno parasitário (SELLS; BURTON, 1981).

Além da detecção de parasitos, a técnica de imunohistoquímica pode ser usada para caracterizar espécies de *Leishmania* (ISMAIL et al., 1997).

1.7 QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Leishmania*

Muitos estudos requerem a detecção e a quantificação de cargas parasitárias de *Leishmania* em diferentes tecidos de camundongo (NICOLAS et al., 2002).

Como o tamanho da lesão pode resultar de uma combinação do número de parasitos com a intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro, esse tamanho nem sempre corresponde ao número de parasitos presente na lesão. LIMA e col. (1997) compararam os trabalhos de diversos autores em termos da relação entre o tamanho da lesão e a carga parasitária em camundongos infectados com *L. major*, e relatou grandes disparidades. Estas observações demonstram que a interpretação de experimentos com *Leishmania*, baseada somente no tamanho da lesão, pode ser errônea, particularmente se o hospedeiro foi imunizado experimentalmente ou tratado com adjuvantes como *Mycobacterium bovis* ou *Corynebacterium parvum* (HILL et al., 1983; LIMA et al. 1997).

A identificação e/ou enumeração de parasitos nos tecidos é crucial em modelos experimentais para monitorar a distribuição dos parasitos com o decorrer do tempo nos órgãos alvo, e avaliar a eficácia de um novo quimioterápico (FERRUA et al., 2001) ou imunoterápico.

As técnicas padrão (coloração de macrófagos com Giemsa, teste de diluição limitante e imprints corados) são laboriosas e tendem a produzir resultados variáveis (ROY et al., 2000). A diluição limitante em cultura de células, e a transformação *in vitro* de amastigotas em promastigotas, demandam no mínimo uma semana de cultivo e necessitam de inspeção microscópica de numerosas diluições. A contagem de amastigotas em imprints corados constitui-se na técnica de referência, mas requer avaliação por um patologista experiente, com longo período de busca,

usando a objetiva de imersão (KHUSMITH et al., 1992) . Parece também que esta técnica produz resultados subestimados (FERRUA et al., 2001).

O crescimento de *Leishmania* em meio livre de células ou em linhagens de macrófagos é feito principalmente por contagem óptica. Entretanto, neste método não há uma fácil distinção entre os organismos vivos e os desintegrados e não é adequado para estudos utilizando grande número de variáveis (GARIN et al., 2001).

A utilização de aspirados esplênicos para a quantificação de parasitos foi usada para avaliar a resposta de pacientes a diferentes protocolos de tratamento para a leishmaniose visceral. Usando uma agulha de 0,5 mm de diâmetro, o volume aspirado é de aproximadamente 5 µl. Considerando como 500 g o peso médio de um baço, estimou-se que o esfregaço apresentar-se-á negativo quando houver menos que 10^5 parasitos neste órgão. Além do mais, já foi encontrado em material de aspirados esplênicos uma grande quantidade de bactérias de diversos tipos e tamanhos, indicando que, provavelmente, a agulha atingiu o intestino (CHULAY; BRYCESON, 1983).

Outro método desenvolvido é a quantificação de promastigotas de *Leishmania* através da detecção da atividade de uma NH (hidrolase nucleosídica) do parasito sobre um substrato cromogênico, o NPR (4-nitrofenil-β-D-ribofuranosídeo). A NH é detectada em um número de protozoários, mas é ausente em células de mamíferos, por isso é uma molécula candidata para detecção e quantificação de protozoários. A determinação de concentrações dos parasitos por este método pareceu ser mais consistente do que a determinação apenas pelos métodos ópticos, talvez devido a dificuldade de uma contagem óptica adequada quando há presença de rosetas, organismos mortos e desintegrados, ou debris (GARIN et al., 2001).

Uma outra abordagem utilizada para quantificação parasitária foi o uso de *L. major* e *L. donovani* recombinantes portanto o gene da luciferase do vaga-lume (LUC). Os parasitos puderam ser detectados após 10 semanas de infecção de camundongos. Uma excelente correlação linear entre o número de parasitos e a atividade de luciferase foi observada em todos os camundongos. Similarmente ao observado na infecção por *L. major*, o número de parasitos de *L. donovani* determinado pela atividade da luciferase foi menor que o número estimado pelas análises microscópicas de imprints. (ROY et al., 2000).

A carga parasitária em lesões de pata e linfonodos de camundongos (BALB/c e C57BL/6) foi também determinada depois da homogenização dos tecidos, corando os amastigotas com laranja de acridina. Desta forma, estes foram facilmente detectados por microscopia de fluorescência, observando-se o forte contraste entre o núcleo e o cinetoplasto verdes em fundo escuro (TORRETERA et al., 2002).

O uso de conjugados ligados a enzimas para a detecção e semi-quantificação de antígenos e anticorpos de interesse parasitológico iniciou-se em 1974 quando Voller e col., usando antígenos de malária e fosfatase alcalina ligada a anticorpo anti-imunoglobulina humana revelaram a presença de anticorpos em indivíduos com malária, através do ensaio que denominaram *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). A partir de então, foram desenvolvidos vários tipos de ELISA (RASSAM; AL-MUDHAFAR, 1980).

Um ELISA *sandwich* baseado na mensuração de antígenos solúveis de *L. infantum* foi capaz de detectar até 5×10^4 amastigotas / 100mg do baço e fígado de camundongo. O método foi preciso e fácil de executar. Pode ser usado em estudos de cinética e avaliação de eficiência de drogas leishmanicidas. O ensaio mostrou-se reprodutivo e não foi detectada reação cruzada, sendo mais sensível que a

observação de parasitos em imprints na determinação da carga parasitária. Este método pode ser aplicado para enumeração de *L. infantum* ou outras espécies de *Leishmania* em diferentes tecidos, como pulmões e medula óssea (FERRUA et al., 2001).

Com a combinação de antisoro de coelho como reagente de captura de antígeno e uma mistura de AcMc biotinilados como reagente de detecção, foi possível a optimização de um ELISA *sandwich* duplo. Antígenos circulantes, provenientes de camundongos infectados com *Trypanosoma brucei* spp., foram detectados com uma sensibilidade maior que a observada na detecção microscópica, que é de 5×10^4 células / ml. Entretanto, picos de parasitemia não foram temporalmente associados a concentração de antígenos e vice-versa (LIU; PEARSON, 1987).

A proteína termogenina foi identificada e quantificada através de um ELISA. O teste pode ser usado para detectar no mínimo 5 µg / mg de proteína de mitocôndria (HANSEN; KNUDSEN, 1985).

Cruzipain e sua extensão C-terminal foram detectados em camundongos infectados com *T. cruzi* através de um ELISA *sandwich*, sendo que seus maiores níveis foram coincidentes com a fase aguda da doença. Estes resultados sugerem uma relação entre os níveis destes antígenos no soro e a parasitemia (GONZÁLEZ et al., 1996).

O exame microscópico para o diagnóstico da malária mesmo feito por um profissional experiente, consome muito tempo, principalmente nos casos em que há uma baixa parasitemia. Foi feito um ELISA de competição entre anticorpos para a detecção de *P. falciparum* onde, quanto maior era a parasitemia, maior era a reprodutibilidade. Entretanto houve apenas uma fraca mas estatisticamente

significante correlação entre a parasitemia e a porcentagem de inibição do anticorpo ($r=0,38$, $p,0,001$) (BUALOMBA et al., 1990). Ainda em malária, um ELISA foi utilizado para a detecção e quantificação de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* em *Anopheles* (Diptera: Culicidae) usando um AcMc. A quantificação foi estimada tomando-se por base a quantidade de uma determinada proteína presente nos esporozoítos. O ensaio mostrou-se extremamente sensível (BAKER et al., 1987). Um ELISA *sandwich* duplo foi desenvolvido, utilizando-se AcMc e anticorpos policlonais, para a detecção de *P. vivax* nos sangue de pacientes. Não foi observada correlação ($r=0,117$) entre a positividade do ELISA e o grau de parasitemia mas ainda assim o autor considerou o ensaio como semi-quantitativo (KHUSMITH et al., 1992).

A detecção microscópica dos esporozoítos de *Plasmodium* na glândula salivar dos mosquitos é usada como indicadora da infectividade do vetor. Entretanto há dificuldades técnicas de quantificação nas glândulas salivares, e na determinação do número de esporozoítos transmitidos durante a picada do mosquito, para determinar o potencial de transmissão do *Plasmodium* pelo do *Anopheles* selvagem. Falhas na detecção microscópica de baixas taxas de infecção nas glândulas podem levar a uma significativa subestimativa do número de esporozoítos na população infectada. Um ELISA utilizando AcMc para quantificar esporozoítos nas glândulas salivares do *Anopheles* não produziu resultados com boa correlação com o número estimado de esporozoítos (BEIER et al., 1991).

Um ELISA *sandwich*, baseado na utilização de um AcMc, foi usado para quantificar antígenos circulantes no soro e urina de pacientes egípcios hospitalizados com esquistossomose. O ELISA mostrou ser uma técnica sensível e altamente específica para o diagnóstico de infecções ativas por *Schistosoma*. Em

muitos estudos encontrou-se uma correlação significativa entre os níveis de antígeno e a intensidade da infecção por *Schistosoma* (LIESHOUT et al., 1994).

Também utilizando um AcMc, foi montado um ELISA *sandwich* de captura para detecção de antígeno solúvel de ovo de *Schistosoma haematobium* no soro ou urina de pacientes infectados. O ELISA provou ser um método altamente sensível e específico para o diagnóstico da esquistossomose e o monitoramento da cura (SALAH et al., 2000).

Não foi relatado qualquer PCR quantitativo adequado para monitorar a infecção por *L. infantum*. Além do mais, para este tipo de teste são necessários numerosos controles internos e externos e precisa-se de um DNA de boa qualidade (FERRUA et al., 2001).

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo possui como objetivos a produção de AcMc anti-*Leishmania chagasi*, padronização de um ensaio de imunohistoquímica para visualização de amastigotas de *Leishmania* utilizando AcMc e verificação do potencial de um ELISA de inibição utilizando AcMc em quantificar amastigotas de *Leishmania*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Produzir e caracterizar AcMc utilizando animais imunizados com parasitos vivos, antígeno bruto ou recombinante.

2.2.2 Padronizar um ensaio de imunohistoquímica utilizando um AcMc já disponível em nosso laboratório e os novos AcMc produzidos.

2.2.3 Verificar o quanto um ELISA de inibição é capaz de quantificar amastigotas de *Leishmania* utilizando os novos e o AcMc já disponível.

3 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses tem se mostrado como doenças emergentes nos últimos anos. São doenças muito mais prevalentes do que se achava e são consideradas pela Organização Mundial da Saúde como uma das seis maiores principais enfermidades dos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990). No Brasil, a leishmaniose visceral americana se apresenta em franca expansão, sendo o Nordeste a região mais atingida (COSTA et al., 1990; NASCIMENTO et al., 1996). Este quadro é agravado devido principalmente às condições sócio-econômicas precárias locais.

O diagnóstico através da demonstração dos parasitos é considerado como o padrão ouro para a leishmaniose visceral. Entretanto, os métodos utilizados para este fim são invasivos, de baixa sensibilidade e difíceis de serem realizados no campo. A confirmação do diagnóstico é altamente desejável por se tratar de uma doença letal se não tratada e, ter uma terapia prolongada, cara e potencialmente tóxica.

A demonstração de parasitos inteiros ou antígeno parasitário é diagnóstica (ISMAIL et al., 1997). A observação do parasito é crucial para o diagnóstico conclusivo de agentes infecciosos (MATSUTSUMI et al., 1991). O ensaio de imunohistoquímica cumpre satisfatoriamente esta função. Na detecção de *Leishmania*, mostrou-se mais sensível que o exame histopatológico tradicional, a observação de amastigotas em imprints, a cultura e a imunofluorescência (SCHUBACH et al, 2001). É um método rápido e simples de ser executado mesmo em laboratórios que não são dotados de grande estrutura. A possibilidade de usar tecidos não congelados é uma vantagem principalmente no que diz respeito a conservação até o momento de serem processados.

Os anticorpos monoclonais são uma ferramenta importante em meios diagnósticos devido a sua elevada especificidade, o que diminui consideravelmente o número de resultados falso-positivos, seja em captura de anticorpos ou de antígenos. É possível padronizar técnicas utilizando AcMc com um mínimo risco de perda deste trabalho devido a serem uma fonte quase inesgotável de reagentes homogêneos, já que um hibridoma é um clone celular que pode ser criopreservado em nitrogênio líquido. As constantes alterações no genótipo da *Leishmania* estimulam a continuação da busca de AcMc restritos a uma espécie/amostra a fim de usá-los também como identificação de espécies de *Leishmania*. Os anticorpos anti-*Leishmania* comercialmente disponíveis são geralmente feitos para ELISA ou imunofluorescência e não são reativos em tecidos fixados (KENNER et al., 1999).

A quantificação de parasitos é indispensável quando se quer avaliar carga parasitária em um indivíduo ou em órgãos específicos. Quando se quer avaliar se uma determinada vacina protege ou não a espécie testada, avaliar a resposta imune celular e humoral não é suficiente, sendo imperativo o uso de técnicas de quantificação de parasitos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE Lc-13

4.1.1 PRODUÇÃO EM MASSA DAS BACTÉRIAS *E. COLI* TOP 10F'-LC-13 E TOP 10F'-PBKCMV SEM INSERTO

As *E. coli* TOP 10F' com o plasmídeo contendo um gen de *L. chagasi* codificando Lc-13 gentilmente cedido por Dr. Geraldo Oliveira (Fundação Oswaldo Cruz, BA) e TOP 10F'-pBKCMV (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA), sem inserto, previamente congeladas, foram repicadas em placas de Petri com meio LB contendo 50 µg / ml de kanamicina (Kanamycin, Sigma Chemical Co, ST. Louis, Missouri, EUA). Em seguida, foi feito um pré-inóculo em meio líquido SOB contendo 50 µg / ml de kanamicina sendo as bactérias incubadas a 37°C, sob agitação constante de 250 rpm por aproximadamente 14 h. Após diluir as culturas de modo a produzir uma densidade óptica de 0,1 para luz de 600 nm em cuveta de 1 cm, elas foram novamente incubadas até atingirem uma absorvância cinco vezes maior, quando foram induzidas com o isopropiltio-β-D-galactosídeo (IPTG; Gibco BRL, Grand Island, N.Y., EUA) a 1,0 mM. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 1, 3 e 5 h. Em cada tempo citado, foram realizadas medições de densidade óptica com filtro de 600 nm sendo centrifugadas a 14.000 g e estocadas -20°C. Depois de 5 h de cultivo, as bactérias foram centrifugadas a 4.000 g a 4°C e estocadas a -20°C em tubos de polipropileno. A expressão de Lc-13 foi verificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). As amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris base a 0,125 M, pH 6,8, SDS a 4 %, glicerol a 20%, 2-β-mercaptoetanol a 2 % p/v e azul de bromofenol a 0,001 % p/v), e fervidas por 5 min.. A quantidade de tampão de amostra usada foi calculada em função das

densidades ópticas encontradas, ou seja, 100 µl para cada precipitado obtido de 1,0 ml de uma suspensão produzindo 1,0 de absorvância para luz de 600 nm em cuveta de 1 cm. Os géis de migração foram preparados com uma concentração final de 12% de poliacrilamida, foram montados em aparelho Mini Trans – Blot Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA) e colocados em uma cuba de eletroforese contendo tampão de corrida (0,3 % de Tris base p/v; 1,4 % de glicina p/v e 0,1 % de SDS p/v; pH 8.3). Após a aplicação dos antígenos nos géis, a corrida foi realizada inicialmente a 80 V por 30 min. e, em seguida, a 120 V por 1 h 30 min.

4.1.2 SEMIPURIFICAÇÃO DE Lc-13

O sedimento contendo as *E. coli* TOP 10F'-Lc-13 foi ressuspenso com tampão de lise (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0, EDTA 10 a mM, NaCl a 100 mM, PMSF a 1 mM e 1 % de Triton X-100). A suspensão foi sonicada em aparelho de ultra-som (Sonifer 450-Bronson, EUA) com 10 ciclos de cinco segundos e centrifugada a 12.500 g a 4°C, sendo este processo repetido quatro vezes, quando então o sedimento foi ressuspenso em solução de salina a 0,15 M tamponada com fosfato, pH 7.2 (PBS) com 8 M de uréia. O material foi dialisado em membrana porosa (Spectra/por, Spectrum Medical Industries, Inc., Los Angeles, California, EUA) com poros de 12-14 kDa com sucessiva diminuição da concentração de uréia (de 6 M, 4,5 M, 3,4 M, 2,6 M, 1,9 M, 1,4 M, 1,1 M para 0,8. M).

O material obtido teve sua concentração de proteína determinado e foi estocado a -20° C. Neste momento também foi feito SDS-PAGE como descrito anteriormente.

4.1.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A dosagem protéica dos antígenos foi feita pelo método de fluorescamina (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) em placa de 96 poços. As amostras foram diluídas em bicarbonato de sódio a 100 mM, pH 8.0, contendo 10 % de Igepal CA-630 (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA), sendo feita uma curva-padrão de albumina sérica bovina diluída no mesmo tampão. Em seguida foram adicionados 10 µl de fluorescamina a 0,1 % (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, EUA) em acetona. A leitura foi feita em um aparelho Titertek Fluoroscan II (Flow Laboratories Inc, McLean, VA, EUA).

4.2 OBTENÇÃO DE AMASTIGOTAS DE *L. chagasi* PURIFICADAS

4.2.1 OBTENÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *L. chagasi*

Promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/96/IOC-LC-2455, cepa MERIVALDO), previamente criopreservadas em nitrogênio líquido, foram cultivadas em meio Schneider (Schneider's insect medium, Sigma Chemical Co, ST. Louis, Missouri, EUA) contendo gentamicina a 100 µg / ml (Garamicina 120 mg, Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e enriquecido com 10 % de soro bovino fetal inativado pelo calor (SBF; Cutilab, Brasil). As garrafas contendo os parasitos eram observadas regularmente em microscópio invertido a fim de avaliar a motilidade e o crescimento assim como a possível presença de microorganismos contaminantes. Os parasitos foram cultivados em passagens regulares até atingirem a fase estacionária de crescimento, quando os promastigotas transformam-se em promastigotas metacíclicos (infectantes) (ZAKAI, 1998). Este momento era

determinado através de contagem em hemocitômetro. As formas promastigotas utilizadas para infecção de hamsters foram oriundas de cultivos com não mais que duas passagens in vitro, e para camundongos, não mais que dez passagens. Parte deste material foi centrifugado a 1.500 g a 4°C por 10 min. e lavado em PBS a 4°C sendo usado em *western-blot*.

4.2.2 INFECÇÃO DE HAMSTERS COM *L. chagasi*

Promastigotas metacíclicos de *L. chagasi*, de cultivo axênico, foram coletados através de centrifugação (1.500 g, durante 10 min., a 4°C), lavados por centrifugação a 4°C em PBS e o sedimento ressuspenso em PBS. A seguir, 10⁹ parasitos foram inoculados, por animal, por via intraperitoneal em *Cricetus auratus golden*, machos e fêmeas, de aproximadamente 40 dias de idade, para a obtenção das formas amastigotas. Os animais foram sacrificados de 2 a 4 meses após a infecção.

4.2.3 PURIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE BAÇO DE HAMSTERS

As formas amastigotas foram purificadas utilizando-se a técnica modificada do gradiente de Percoll descrita por Chang (1980). Ela consistiu na obtenção de células esplênicas de hamsters infectados, através de maceração do baço em HBSS (Hank`s Balanced Salts; Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA), contendo ácido etileno diamino tetracético dissódico (EDTA) a 2 mM, seguida de lise das hemácias através de incubação com cloreto de amônio a 0,85 % por 10 min. Após passagens sucessivas em seringa com agulha 13/4 mm e centrifugação a 500 g, durante 10 min., a 4°C, para sedimentar detritos celulares, a suspensão foi submetida à duas centrifugações (2.000 g, durante 10 min., a 4°C). A suspensão contendo os parasitos

foi colocada em um tubo contendo uma camada inferior de Percoll a 100 % e outra superior de 45 % de Percoll em PBS (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) e centrifugada a 2.000 g durante 30 min., a temperatura ambiente. As formas amastigotas foram retiradas de um anel localizado na parte média da preparação e lavadas uma vez com HBSS contendo 0,1 % de BSA e uma vez com HBSS puro, a 2.000 g, por 10 min., a 4°C. Os amastigotas purificados foram contados e preservados a -70° C até o uso.

4.3 PREPARO DE ANTÍGENOS DE *L. chagasi*

4.3.1 ANTÍGENOS DE AMASTIGOTAS

Os amastigotas de *L. chagasi* foram ressuspensos a 10^9 parasitos / ml em PBS contendo os seguintes inibidores de protease: leupeptina a 5 µg / ml, pepstatina a 5 µg / ml, aprotinina a 2 µg / ml, trans-epoxysuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano a 8 µg / ml (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) e EDTA a 2 µg / ml (etilenodiaminotetracético, Dinâmica, Brasil) e sonicados em aparelho de ultra-som com 5 ciclos de 10 segundos. Após centrifugação a de 13.800 g a 4°C, os sobrenadantes foram aliquotados, dosados por fluorescamina quanto ao teor protéico e armazenados a -70° C.

4.4 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

4.4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, de aproximadamente 40 dias de idade, oriundos do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador-Bahia.

4.4.2 IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENO DE AMASTIGOTAS DE *L. chagasi*

Seis camundongos foram injetados com um antígeno de amastigotas emulsionado em adjuvante completo de Freund na proporção de 1:1 (0,4 ml de volume final contendo 120 µg de proteína de amastigotas. Foram aplicadas mais duas doses idênticas à primeira, com 21 dias de intervalo, sendo estas com adjuvante incompleto de Freund. As doses foram administradas da seguinte forma: metade do volume total por via intraperitoneal e a outra metade dividida na região inguinal entre os antímeros direito e esquerdo, por via subcutânea.

4.4.3 IMUNIZAÇÃO ATRAVÉS DE INFECÇÃO COM PROMASTIGOTAS VIVOS DE *L. chagasi*

Foram utilizados dez camundongos BALB/c, que foram inoculados sete vezes com 10^7 promastigotas metacíclicos (infectantes) de *L. chagasi*, em fase estacionária, por via intra-venosa, no plexo retro-orbital, com intervalos de aproximadamente sete dias.

4.4.4 IMUNIZAÇÃO COM O ANTÍGENO RECOMBINANTE LC- 13

O protocolo de imunização foi o mesmo utilizado para os antígenos de amastigotas utilizando-se doses de 100 µg de Lc-13 por animal.

4.5. EFICÁCIA DAS IMUNIZAÇÕES

No décimo dia após a última injeção, foi testada a eficácia das imunizações nos diferentes grupos através da dosagem de anticorpos pela técnica de ELISA indireto, em placa de 96 poços sensibilizados com antígeno de amastigotas de *L.chagasi* (50 µg / ml) ou Lc-13 (2 µg / ml), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M, pH 9,8, sempre usando um volume de 100 µl por poço. Os soros dos animais foram testados com diluições seriadas de 1:300 a 1:8.100 para os grupos imunizados com *L. chagasi*, e de 1:2.000 a 1:250.000 para o grupo imunizado com antígeno recombinante. A sensibilização foi realizada por incubação durante 16 h, a 4°C. Em seguida, os sítios de ligação de proteínas possivelmente ainda disponíveis nos poços, foram bloqueados com PBS contendo leite desnatado em pó a 10 % (PBS-leite), sendo então incubadas. Após lavagens, as amostras de soros-controle e soros-testes foram então adicionadas às placas, em duplicatas, diluídas em PBS-leite contendo 0,05 % de tween-20 (PBS-leite-T20) e incubadas, seguido de lavagens. Um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Anti-mouse IgG-whole molecule peroxidase conjugate, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) diluído a 1:2.000 em PBS-leite-T20 foi adicionado e incubado à 37°C, durante 1 h, em câmara úmida. Após lavagens, 100 µl do revelador da reação, contendo aproximadamente 5 µg do cromógeno orto-fenileno-diamino (OPD, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA), 5,0 µl de peróxido de hidrogênio a 30 % e 6 ml no

tampão de ácido cítrico a 0,1 M e fosfato de sódio a 0,2 M, foram adicionados aos poços e incubados por 10 min. à temperatura ambiente, em ausência de luz. A reação foi interrompida com 25 μ l de H₂SO₄ a 4M e a leitura da absorvância feita em leitor de ELISA, com filtro de 490 nm. As lavagens consistiram de três jatos com PBS contendo Tween 20 0,05 % (PBS-T-20) e dois com PBS puro e as incubações foram a 37°C por 1h em câmara úmida.

O animal de cada grupo que demonstrou ter produzido uma melhor resposta humoral foi injetado com uma dose de 100 μ g do antígeno de amastigotas, ou 50 μ g do respectivo antígeno recombinante, esterilizados por radiações gama (CIS bio international-IBL 437C) a 267 rad / min. durante 2 h, por via intravenosa através do plexo retro-orbital. Cada camundongo selecionado foi utilizado quatro dias após para a fusão celular.

4.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

4.6.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS (PEC)

Camundongos BALB/c normais foram sacrificados por deslocamento cervical e após devida assepsia tiveram o peritônio exposto e a cavidade peritoneal lavada com 10 ml de solução de HBSS e heparina (40 UI / ml) a 4°C. As células da suspensão obtida foram sedimentadas através de centrifugação (500 g, por 10 min., a 4°C) e ressuspensas em 20 ml de RPMI contendo 10% de SBF, glutamina 2mM, e piruvato 10 mM (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA). Cem microlitros da suspensão de células (4×10^4 / ml) foram depositados nos poços de duas placas de cultivo celular quando se coletou o PEC de um camundongo. As placas foram então

incubadas à 37°C com 5 % de CO₂ e 90% de umidade. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

4.6.2 PREPARO DE CÉLULAS DO MIELOMA SP2-0

Células de mieloma SP2-0 foram cultivadas em RPMI contendo 10 % de SBF, glutamina a 2mM e piruvato a 10 mM, a 37°C com 5 % de CO₂ e 90 % de umidade. As células foram tratadas previamente com 8-azaguanina para eliminar células expressando o gene da hipoxantina-guanina-fosforibosil transferase (HPRT). Depois, foi feito um teste de sensibilidade a mistura hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,04 mM) e timidina (0,16 mM) (HAT; Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA). Quando as células estavam semi-confluentes, o meio de cultura contido nos frascos foi trocado por HBSS sem cálcio e magnésio a 4°C e os frascos incubados sobre o gelo por 10 min. Feito isto, as células foram descoladas gentilmente dos frascos, através de pipeta descartável e centrifugadas por 10 min. a 500 g e a 4°C e contadas. Em seguida, elas foram adicionadas a frascos novos com meio de cultura também novo.

4.6.3 PREPARO DE ESPLÊNOCITOS

O camundongo identificado como o melhor respondedor à imunização foi sacrificado por deslocamento cervical e após assepsia teve o abdômen aberto por planos. Após exposição da cavidade peritoneal, o baço foi retirado, e colocado em placa de Petri contendo HBSS a 4°C. A partir desta etapa, foram usados dois protocolos para as diferentes fusões e grupos:

a) Camundongos imunizados com antígeno de amastigotas

Foi injetado HBSS nos baços, que em seguida foram macerados com êmbolo de seringa estéril. Depois, todo o conteúdo da placa foi depositado em um tubo de 50 ml, que foi incubado sobre gelo por 10 min. quando, então, o seu sobrenadante foi transferido para outro tubo com a mesma capacidade.

b) Camundongo imunizado com o antígeno recombinante Lc-13

O baço foi lavado três vezes em HBSS a 4°C, quando então foi dissecado retirando-se o tecido conjuntivo. Em seguida, foi lavado mais uma vez com HBSS e dissecado com o auxílio de uma pinça de pontas finas. Depois, a suspensão foi passada em uma coluna com gase e o material filtrado e recolhido em um tubo de 50 ml.

A seguir, essa suspensão foi lavada duas vezes com HBSS à 4°C. As células foram contadas, ressuspensas em 5 ml de HBSS e mantidas à temperatura ambiente até o momento da fusão.

4.6.4 FUSÃO CELULAR

Foi utilizada uma proporção de 10^7 células do mieloma SP2-0 para 10^8 esplenócitos de camundongo imunizado. Após ambos os tipos celulares terem sido misturados, a suspensão foi centrifugada (50 g, durante 5 min., à temperatura ambiente) e, ao sedimento, foi adicionado 0,8 ml de polietilenoglicol (PEG 3700, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) diluído a 1:2 em HBSS pH 8,0 para cada 10^8

esplenócitos, lentamente e sempre movimentando cuidadosamente o sedimento na temperatura de 37°C. A suspensão foi então incubada por 1 min. e em seguida foram adicionados lentamente 50 ml de RPMI ao tubo e, após centrifugação (50 g, durante 5 min., a temperatura ambiente), as células foram ressuspensas em meio RPMI contendo 10 % de soro bovino fetal, glutamina a 2 mM, piruvato a 10 mM e gentamicina a 80 µg / ml (RPMI completo) e distribuídas em volumes de 100 µL por poço. Em um mesmo dia, foram executadas duas fusões: uma delas com os esplenócitos do camundongo imunizado com amastigotas, sendo utilizadas 5,5 placas de cultivo de 96 poços, e a outra, com promastigotas vivos, usando-se o mesmo número de placas. Na fusão com os esplenócitos dos camundongos que receberam Lc-13, foram utilizadas 11 placas. Todos os poços continham uma camada de PEC em 100 µl de RPMI completo. As células foram incubadas a 37°C, 5 % de CO₂ e 90 % de umidade. Após 24 h de incubação, 100 µl do meio de cultivo foram trocados por 100 µL do meio seletivo RPMI completo contendo 2 % de HAT. Metade do meio foi renovado a cada três dias por novo meio contendo 2 % de HAT e a seleção dos poços positivos foi feita através da observação do crescimento de clones em microscópio invertido, que foi concluída em aproximadamente 20 dias. Nesse momento, o meio de cultivo que passou a ser utilizado foi o RPMI completo com 2 % do preparado HT (hipoxantina 0,1 mM e timidina 0,16 mM); Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA).

4.6.5 SELEÇÃO DOS HIBRIDOMAS (ELISA)

Foram retirados 140 µL dos sobrenadantes dos poços que apresentaram proliferação celular, nas duas primeiras fusões e, 100 µL na fusão, utilizando o Lc-

13, a fim de testar a produção de anticorpos através de ELISA indireto. Este sobrenadante foi diluído a 1:2 com PBS contendo PBS-leite-T20. Na sensibilização das placas foram utilizados como antígenos lisados solúveis de amastigotas de *L. chagasi*, Lc-13 ou o material proveniente das *E. coli* TOP 10F' - pBKCMV sem inserto, preparados como descrito anteriormente. As colônias produtoras de anticorpos específicos foram transferidas para placas de 24 poços contendo PEC e depois clonadas por diluição limitante e expandidas para frascos de cultivo celular. A maior parte das células expandidas foi congelada em meio RPMI completo com 47 % de SBF e 8% de dimetil sulfoxido (DMSO), inicialmente à -70°C e posteriormente em nitrogênio líquido.

4.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE DUODECIL SULFATO DE SÓDIO (SDS-PAGE) E *WESTERN-BLOT*

A identificação dos antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) seguida de *Western-blot*. Para testar os AcMc anti-*Leishmania*, os antígenos usados foram um lisado total de amastigotas de *L. chagasi*, os antígenos solúveis deste lisado e um lisado total de promastigotas, diluído em tampão de amostra; o antígeno solúvel foi diluído 1:2 em um tampão com o dobro da concentração. Metade dos géis com antígeno de amastigotas foram usados em condições não desnaturantes e a outra metade em condições desnaturantes, ou seja, na presença 2-β-mercaptoetanol a 2 % e fervidas por 5 min. Os géis foram submetidos a eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose com 0,45 μm (BioAgency Laboratories, Miami, Florida, EUA) por 1 h 45 min. em tampão de transferência (Tris base a 0,025 M, glicina a 0,93 M, metanol 20

% pH 8,3). Após a transferência, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau S. Em seguida, sítios de ligação remanescentes nas membranas foram bloqueados para reações inespecíficas com PBS-leite contendo azida sódica (sodium azide; Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) a 0,05 % e as membranas mantidas em incubação a 4°C por no máximo quatro dias até o uso. Também foram preparados géis com 12 % de acrilamida para amostras de Lc-13, pBKCMV-pRSET B sem inserto e um lisado de promastigotas, todos em condições desnaturantes.

As membranas contendo os antígenos foram lavadas com PBS-T-20, seguida por PBS puro e incubadas por 1 h com os sobrenadantes dos clones e com os controles em um aparelho Mini-protein II cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA). Os controles usados foram soros de camundongo infectado com *L. chagasi* (1:1.000), imunizado com Lc-13 (1:2.000) e de camundongo normal (1:1.000), assim como, PBS-leite-T20. As membranas foram lavadas e incubadas com anti-imunoglobulina polivalente de camundongo conjugada à peroxidase (Anti-mouse polyvalent immunoglobulins peroxidase conjugate, Sigma Chemical Co, St.Louis, EUA), diluída à 1:1.000 em PBS-leite-T20, durante o mesmo período de tempo. As membranas foram lavadas e a reação revelada através de incubação com PBS contendo 0,03 % de H₂O₂ e 600 µg de 3,3'-diamino benzidina (DAB, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) por mililitro durante 5 min., à temperatura ambiente. A solução que serviu de substrato foi removida e as membranas lavadas com água destilada. Para o cálculo do peso molecular foram medidas as distâncias em milímetros das bandas formadas pelas proteínas do padrão de peso molecular e estabelecida uma curva-padrão. Os pesos moleculares reconhecidos pelos AcMc foram calculados através de regressão linear.

4.8 ANÁLISE DAS SUBCLASSES E ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS DOS AcMc

Os poços de uma placa de 96 poços foram sensibilizados com anticorpo anti-IgM de camundongo (goat anti-mouse IgM, American Qualex, EUA), diluído à 1:1.000, ou com anti-IgG de camundongo (goat anti-mouse IgG, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) a 40 μg / ml em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9.6. O bloqueio dos sítios de ligações para proteínas remanescentes foi feito com PBS-leite, conforme descrito anteriormente. Os poços foram lavados e os sobrenadantes dos hibridomas foram aplicados aos poços e incubados por uma hora a 37°C em câmara úmida. Após as lavagens, foram aplicados e incubados por uma hora os conjugados biotinizados anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b e anti-IgG3 de camundongo (PharMingen, EUA) diluídos a 1:750 em PBS-leite. Em seguida, os poços foram lavados e incubados com extravidina ligada a peroxidase (Extravidin peroxidase, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA), na diluição de 1:1.000, em PBS-leite, pelo mesmo período de tempo. Após as lavagens, as reações foram reveladas com aproximadamente 5 μg do cromógeno orto-fenileno-diamino (OPD, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em 12,6 ml de um tampão composto por ácido cítrico a 30 mM e fosfato de sódio a 50 mM, contendo 0,01 % de peróxido de hidrogênio. Bloqueada a reação com H_2SO_4 a 4 N, a leitura foi realizada em leitor de ELISA com filtro de 490 nm. As lavagens foram realizadas três vezes com PBS-T20, seguidas de duas lavagens com PBS e as incubações foram a 37°C / 1 h em câmara úmida.

4.9 SEMIPURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO EM SULFATO DE AMÔNIO $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

As ascites provenientes de camundongos BALB/c que receberam células do clone 5A9H8(H2) estavam disponíveis no Laboratório de Imunologia Molecular e Celular, do CPqGM estocadas a -20°C . Após serem descongeladas foram 1:2 (v:v) diluídas em PBS e foi gotejado sobre a diluição sulfato de amônio saturado. Em seguida a solução foi agitada por 40 min. a temperatura ambiente, sendo depois submetida à centrifugação a 1.500 g por 15 min. a 4°C . Foi então lavada com PBS contendo 40 % da solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dissolvido em Tris 20 mM. O material foi centrifugado a 1.500 g por 15 min. e o sobrenadante dialisado contra tampão Tris a 20 mM pH 8,0 em membrana com poros de 12-14 kDa. O conteúdo foi centrifugado a 16.000 g por 10 min. a 4°C e o sobrenadante foi estocado a -20°C , sendo retirada antes uma alíquota para a dosagem de proteína. Esta foi realizada por colorimetria, onde cada 1,43 unidades de densidade óptica a 280 nm em cuveta de 1 cm equivalem a 1,0 mg / ml de IgG.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE *Leishmania* COM AcMc ATRAVÉS DE UM ELISA DE INIBIÇÃO

4.10.1 QUANTIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS USANDO UM AcMc

O AcMc 5A9H8(H2) foi titulado através de um ELISA indireto, testando-se as diluições 1:800, 1:1.600, 1:3.200, 1:6.400, 1:12.800, sendo determinada uma diluição no início da parte descendente da curva de anticorpo versus diluição. Poços de uma placa de microtécnica sensibilizadas com antígeno solúvel de amastigotas

de *L. chagasi* a 30 µg / ml, receberam 100 µl deste AcMc na diluição citada acima incubado previamente por 1h a temperatura ambiente com quantidades do mesmo antígeno usado na sensibilização correspondendo a 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10³, 10² e 0 parasitos. Após incubação, a placa foi lavada e o ELISA processado (veja item 4.6.5 acima).

4.10.2 QUANTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS USANDO VÁRIOS AcMc

Sobrenadantes de cultivo de hibridoma contendo o AcMc 2C10D5 e o AcMc 11E8H7 também foram titulados por ELISA indireto em placa sensibilizada com Lc-13, nas diluições de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e puro; da mesma forma foram titulados os AcMc 10B4/6 e 10D8, nas diluições de 1:2, 1:10, 1:50, 1:250 e 1:1250, em placa sensibilizada com antígeno de amastigotas. Escolhidas diluições dos AcMc, no início da porção descendente da curva de atividade de anticorpo versus diluição, foi feito um ensaio de inibição de ligação do AcMc, como no item anterior, com os diferentes monoclonais e com os AcMc 10B4/6, 10D8, 5A9H8(H2) juntos.

4.11 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE *L. chagasi*

Fragmentos de fígado de hamsters doentes, infectados com *L. chagasi*, foram fixados em formalina tamponada por 24 h e montados em parafina. Foram cortadas seções com 4 µm de espessura e estas foram observadas ao microscópio óptico. Em seguida, foi feita a desparafinização e hidratação dos cortes com dois banhos de xileno por 10 min., dois banhos com álcool absoluto comercial de 5 min., um banho de 1 min. em álcool a 70, 50 e 30 %, três banhos rápidos em água corrente e três

em água destilada, sucessivamente. As seções foram então circundadas com caneta *Papen* (Dako Pen, Dako, Dinamarca) e a exposição dos antígenos nelas presentes foi tentada por diferentes metodologias:

- a) Os cortes foram imersos em tampão citrato pH 6,0 (ácido cítrico a 0,21 % corrigido com NaOH a 2 N) e submetidos a microondas (Pratice, Consul, Brasil) com potência 8 por 5 min., potência 7 por 3 min. e potência 4 por 2 min., resfriados por 20 min. e lavados duas vezes com água destilada;
- b) Os cortes foram imersos em tampão citrato e expostos a vapor (steam cuisine 700, T-FAL, PRC) a temperatura máxima de 99° por 20 min.;
- c) Os cortes foram incubados com pronase (Pronase for immunohistochemistry, Dako, Dinamarca) a 0,005 % em PBS, por 5 min. a temperatura ambiente;
- d) Os cortes foram tratados com tripsina (10 mg de Trypsina 1:250, Gibco BRL, Grand Island, N.Y., EUA; 90 mg de NaCl, 13,2 mg de CaCl₂.H₂O e 10 ml de água destilada) a 37°C durante 30 min.

Após os tratamentos para exposição de antígenos, foram feitos dois banhos com PBS-T-20 de 5 min. cada. Após os banhos, foi realizada a inibição das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 0,9 % em metanol por 20 min., seguida de dois banhos com água destilada. Em um dos experimentos, usou-se PBS com H₂O₂ no lugar do metanol com H₂O₂, após a incubação com os anticorpos primários e não antes desta. Procedeu-se mais dois banhos com PBS-T20 e foi feito bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas com 3 % de leite desnatado e 10 % de soro de hamster normal em PBS-T20. Foi então colocado sobre os cortes, aproximadamente, 70 µL dos AcMc 5A9H8(H2), 10B4/6, 10D8 e dos controles (soro de camundongo infectado com promastigotas vivos de *L. chagasi*

e soro de camundongo normal), sendo estes incubados durante a noite a 4°C em câmara úmida. As seções foram deixadas a temperatura ambiente por no mínimo 30 min. quando foram novamente banhadas e incubadas com uma solução de conjugado de peroxidase anti-IgG de camundongo previamente diluída pelo fabricante de modo a ser utilizada sem diluições adicionais no ensaio (Peroxidase labelled polymer conjugated to anti-mouse and anti-rabbit immunoglobulins, Dako, Dinamarca), ou de peroxidase com anti-imunoglobulina de camundongo polivalente (Anti-Mouse polyvalent immunoglobulins peroxidase conjugate, Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA) diluído a 1:50 em s albumina bovina (BSA) a 1 % por 30 min., a temperatura ambiente. Em seguida as seções foram banhadas e incubadas com 600 µg / ml de DAB, 1 % de DMSO e 0,1 % de peróxido de hidrogênio em PBS. A reação ocorreu em no máximo cinco min., quando então os cortes foram banhados em água destilada por 5 min.

A contra-coloração foi feita com hematoxilina filtrada e os cortes foram lavados, imediatamente, com água corrente e depois com água destilada, e banhadas duas vezes, rapidamente, em álcool absoluto e quatro vezes em xileno, sendo o primeiro, um banho rápido e os demais de 5 min. cada. As lâminas foram, finalmente, montadas com lamínula e bálsamo do Canadá.

Também foram usados cortes de tecidos congelados fixados em álcool absoluto por 10 min., em seguida, álcool 70 % também por 10 min., dois banhos com PBS de 15 min. Depois foi feito o bloqueio da peroxidase endógena e o bloqueio das ligações inespecíficas. A metodologia empregada foi a mesma para os tecidos fixados em formalina excetuando-se que não houve a etapa de exposição de antígenos e a incubação do anticorpo primário foi de apenas 1 h.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE Lc -13

Foi observada uma expressão de Lc-13, analisada em SDS-PAGE (Figura 1). Como o nível de expressão encontrado foi adequado, esta proteína foi semipurificada, obtendo-se um material adequado para a imunização dos animais (Figura 1).

5.2 SEMIPURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE Lc-13

Obteve-se aproximadamente 140 mg de proteína para cada 1,5 litros de cultura de bactérias expressando a Lc-13. Entretanto, esta quantidade representa somente parte da proteína recombinante de *L. chagasi*. O processo executado não consegue retirar muitas das proteínas contaminantes de *E. coli* como visto no na Figura 1.

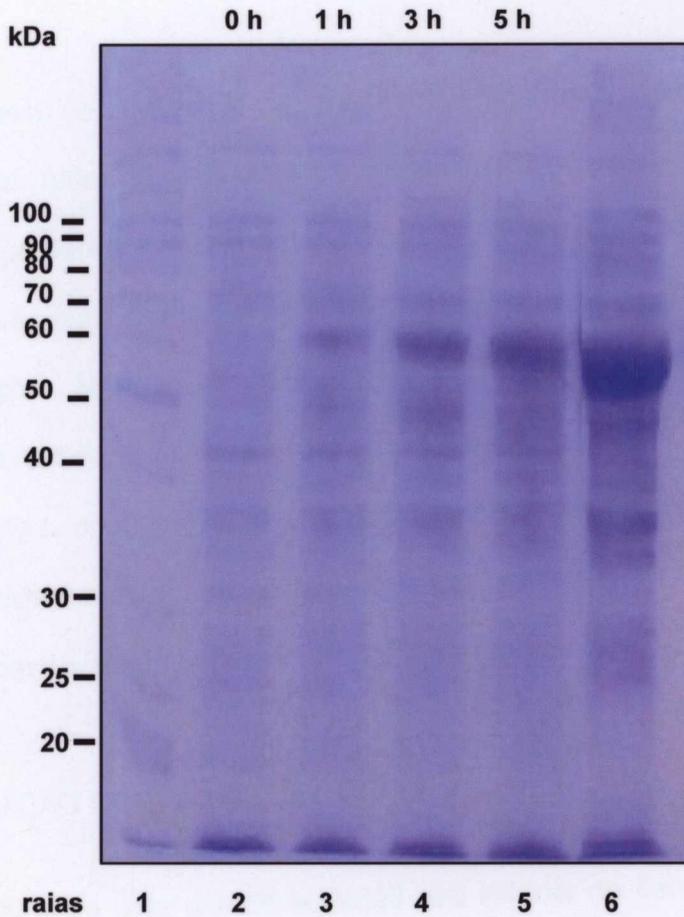


Figura 1. Análise da expressão de antígenos recombinantes através de SDS-PAGE e coloração com azul de Coomassie. Lisados de *E. coli* TOP 10F'– Lc-13 pré-incubados com 1 mM de IPTG pelos períodos indicados no topo da figura foram aplicados nas raias de 2 a 5. Na raia 6 foi aplicado o corpúsculo de inclusão semipurificado obtido do cultivo de bactérias expressando a proteína Lc-13. Marcadores de peso molecular (raia 1) estão indicados à esquerda.

5.3 PURIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE BAÇO DE HAMSTERS

O processo de purificação de amastigotas mostrou-se como uma metodologia muito laboriosa. Além de necessitar de diversos reagentes e soluções, também foi necessário a presença de uma equipe treinada, principalmente nos momentos em que trabalhou-se com diversos hamsters. trabalho este que, por vezes, perdurou até 18 h ininterruptas. Também foram observadas variações nos resultados, seja quanto a quantidade obtida, seja quanto a qualidade de pureza e de integridade das amastigotas de *L. chagasi*. As perdas ocorreram principalmente durante o gradiente de Percoll, onde a redução nunca foi menor que dez vezes da quantidade inicial. Na melhor purificação, foram obtidas $1,2 \times 10^9$ amastigotas, por hamster.

5.4 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Observou-se uma grande variação nas leituras de densidades ópticas entre os diferentes animais de cada grupo. As curvas de titulação dos animais imunizados com promastigotas vivos e com o lisado de amastigotas de *L. chagasi* podem ser vistas na Figura 2. A imunização com o antígeno recombinante Lc-13 produziu títulos mais altos do que o imunizado com *Leishmania* (Figura 3).

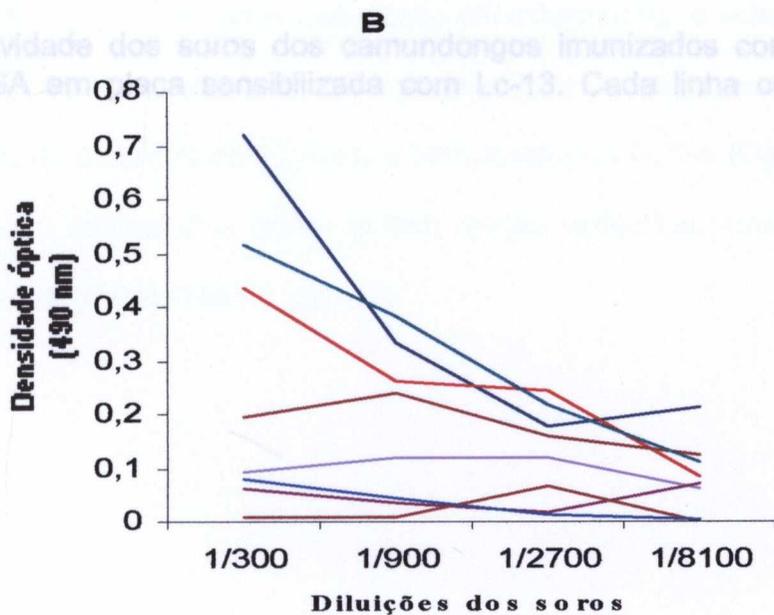
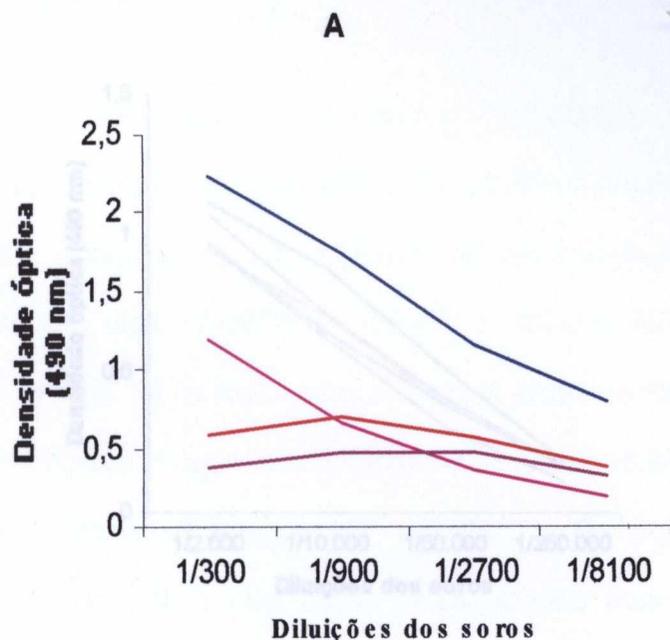


Figura 2. Reatividade de soros de camundongos em poços de placas de ELISA sensibilizados com antígenos de amastigotas de *L. chagasi*. Cada linha corresponde a um animal. **A.** Camundongos imunizados com lisado de amastigotas semipurificadas do fígado de hamsters infectados com *L. chagasi*. **B.** Camundongos imunizados através de infecção com promastigotas metacíclicos de *L. chagasi*.

5.6 HIBRIDOMAS PRODUZIDOS

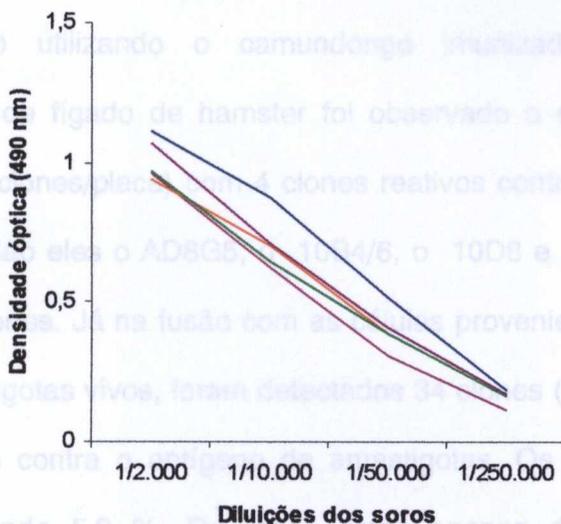


Figura 3. Reatividade dos soros dos camundongos imunizados com Lc-13 medidas através de ELISA em placa sensibilizada com Lc-13. Cada linha corresponde a um animal.

Já na fusão com esplenócitos do camundongo imunizado com Lc-13, observou-se um grande número de clones em crescimento, a saber, 375 (média de 10,7 clones/placa). Dos clones reativos contra o lisado de amastigotas de *L. chagasi*, selecionamos o AD8G6, o 10A4/6, o 10D8 e AE509, o que equivale a 6,7 % destes clones. Já na fusão com as células provenientes do animal imunizado com os promastigotas vivos, foram detectados 34 clones (6,2/placa), sendo que dois destes reagiram contra o lisado de amastigotas, os clones são o 10A11 e o C12D9, perfazendo 5,9 %. Dos clones estes apenas dois deles permaneceram produzindo estavelmente anticorpos.

O uso de bactérias com inserto e sem inserto no ELISA (Figura 4) permitiu a determinação apenas dois clones tinham reação específica para Lc-13, o que foi confirmado em *Western-blot* (Figura 5).

5.5 HIBRIDOMAS PRODUZIDOS

Na fusão utilizando o camundongo imunizado com os amastigotas semipurificados de fígado de hamster foi observado o crescimento de 59 clones (média de 10,7 clones/placa) com 4 clones reativos contra o lisado de amastigotas de *L. chagasi*. São eles o AD8G5, o 10B4/6, o 10D8 e AE5C9, o que equivale a 6,7 % destes clones. Já na fusão com as células provenientes do animal imunizado com os promastigotas vivos, foram detectados 34 clones (6,2/placa), sendo que dois destes reagiram contra o antígeno de amastigotas. Os clones são o 10A11 e o C12D9, perfazendo 5,9 %. De todos estes apenas dois deles permaneceram produzindo estavelmente anticorpos .

Já na fusão com esplenócitos do camundongo imunizado com Lc-13, observou-se um grande número de clones em crescimento, a saber, 375 (média de 34,1/placa). Destes, praticamente 100 % deles foram reativos para antígenos de *E. coli*. O uso de bactérias com inserto e sem inserto no ELISA (Figura 4) permitiu a determinação apenas dois clones tinham reação específica para Lc-13, o que foi confirmado em *Western-blot* (Figura 5).

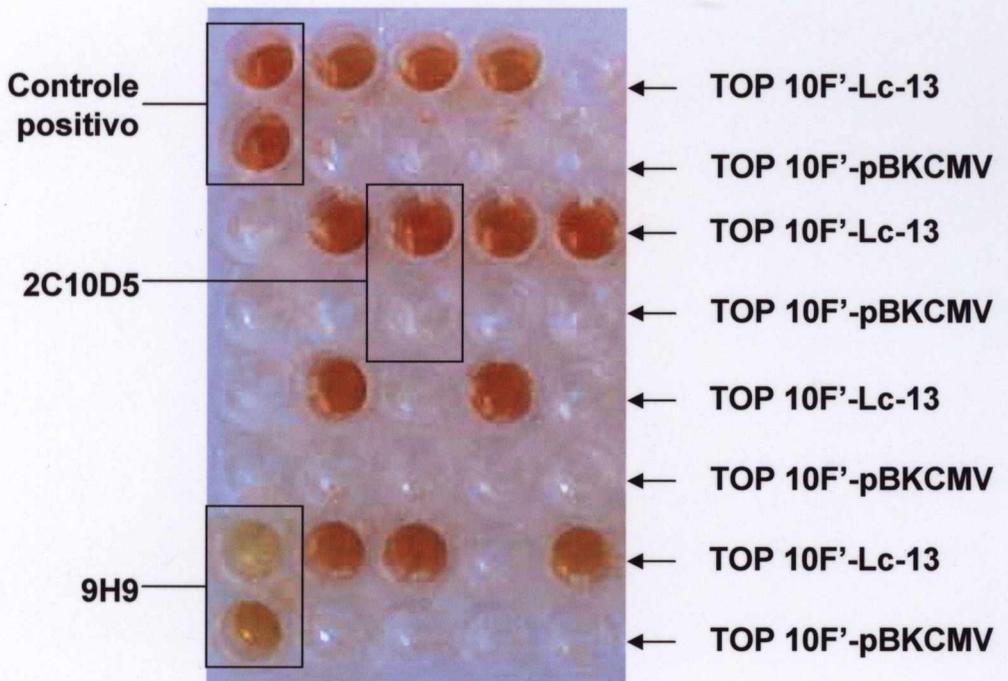


Figura 4. Modelo de sensibilização das placas de ELISA usadas na triagem dos AcMc anti-Lc-13. O controle positivo usado foi o soro de um camundongo imunizado com Lc-13. 2C10D5 representa um clone selecionado e 9H9 representa um não selecionado. A direita são mostradas as bactérias das quais se obteve os antígenos que foram usados na sensibilização dos poços nas linhas indicadas. TOP 10F'-pBKCMV é a *E. coli* sem inserto e TOP 10F'-Lc-13 é a bactéria expressando o antígeno Lc-13.

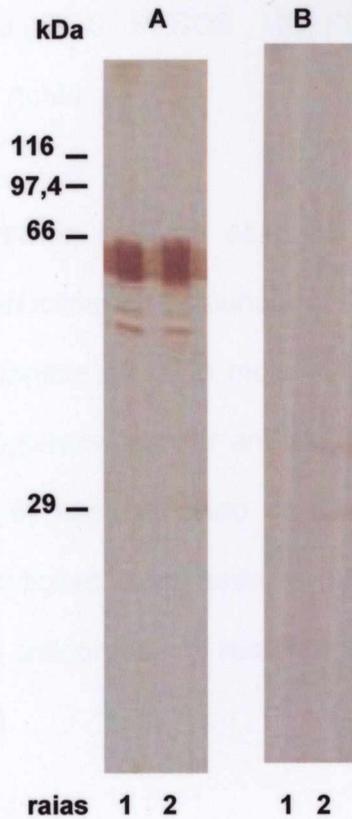


Figura 5 . Reação dos anticorpos monoclonais (AcMc) obtidos a partir de esplenócitos de camundongos imunizados com o antígeno recombinante Lc-13 com lisados de bactérias expressando o antígeno recombinante. A raia 1 corresponde ao AcMc 2C10D5 e a raia 2 ao 11E8H7. Membranas provenientes de transferência de gel de poliacrilamida onde foram aplicadas as *E. coli* TOP 10F'-Lc-13, que expressa o antígeno Lc-13 (A) e TOP 10F'-pBKCMV sem inserto (B). As posições de marcadores de peso molecular estão indicadas à esquerda.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DOS PESOS MOLECULARES DOS ANTÍGENOS RECONHECIDOS PELOS AcMc

Através de *western-blot*, pôde-se observar que os AcMc 10B4/6 e 10D8 (obtidos a partir de esplenócitos de camundongos imunizados com um lisado de amastigotas), revelaram bandas de peso molecular aparente de aproximadamente 47 a 57 kDa, e eles conseguiram detectar em condições não desnaturantes, tanto o antígeno solúvel (Figura 6) como o bruto de *L. chagasi* (Figura 7). Entretanto, quando foram usadas condições desnaturantes, eles só reconheceram o antígeno bruto de *L. chagasi*. Estes anticorpos não reagiram com promastigotas de *L. chagasi* em *western-blot* (Figura 8).

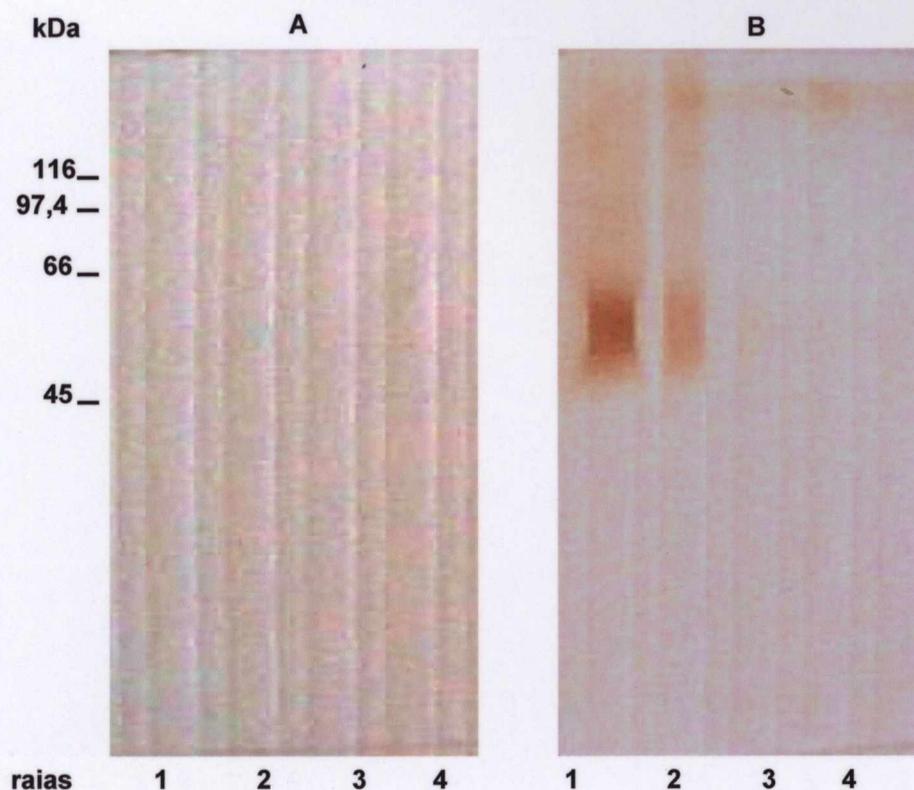


Figura 6. Demonstração por *Western-blot* do peso molecular aparente dos antígenos solúveis de amastigotas de *L. chagasi* reconhecidos por anticorpos monoclonais (AcMc) obtidos a partir de esplenócitos de camundongos imunizados com lisado de amastigotas presentes na fração solúvel. As reações dos anticorpos foram feitas em membranas provenientes de transferência de géis de poliacrilamida onde foi aplicado antígeno solúvel em condições desnaturantes (A) e não desnaturantes (B) de *L. chagasi*. AcMc 10B4/6 (raia 1), AcMc 10D8 (raia 2), soro de camundongo normal (raia 3) e PBS-leite (raia 4). As posições de marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

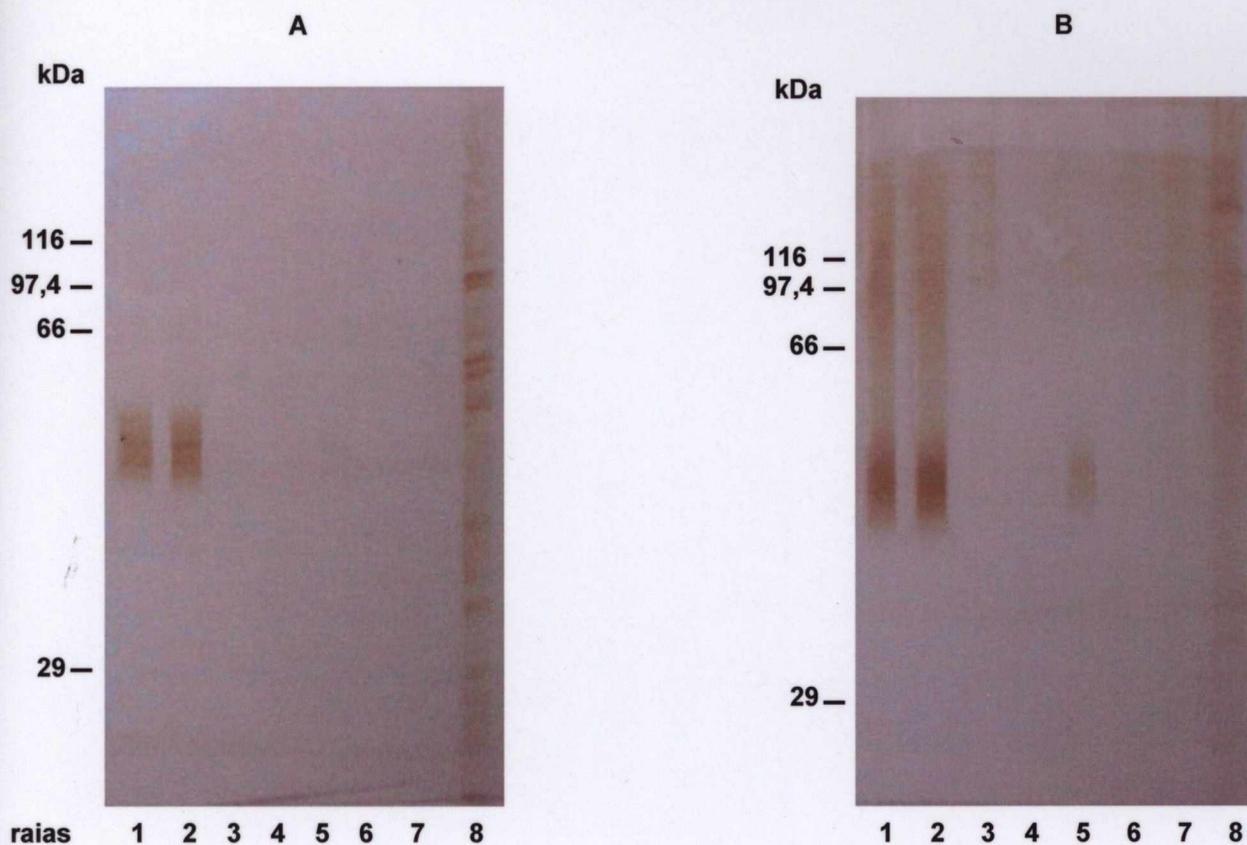


Figura 7. Demonstração por *western-blot* do peso molecular aparente dos antígenos totais de amastigotas de *L. chagasi* reconhecidos por anticorpos monoclonais (AcMc). As reações dos anticorpos foram feitas em membranas provenientes de transferência de géis de poliacrilamida onde foi aplicado antígeno bruto em condições desnaturantes (A) e não desnaturantes (B) onde foi aplicado antígeno bruto de *L. chagasi*. Os AcMc utilizados foram obtidos a partir de esplenócitos de camundongos imunizados com lisado de amastigotas (AcMc 10B4/6, raia 1; AcMc 10D8, raia 2) ou com o antígeno recombinante Lc-13 (AcMc 2C10D5, raia 3; 11E8H7, raia 4). Além disso foram utilizados como controle um soro de camundongo normal (raia 6), PBS-leite (raia 7) e um soro de camundongo imunizado com promastigotas metacíclicos vivos (raia 8). As posições de marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.



Figura 8. Demonstração por *Western-blot* do antígeno bruto de promastigotas de *L. chagasi* detectados pelos AcMc. O substrato usado na reação foi o DAB. Membranas provenientes de transferência de gel de poliacrilamida. Os AcMc utilizados foram obtidos a partir de esplenócitos de camundongos imunizados com lisado de amastigotas (AcMc 10B4/6, raia 3; AcMc 10D8, raia 4) ou com o antígeno recombinante Lc-13 (AcMc 2C10D5, raia 1; 11E8H7, raia 2). Além disso foram utilizados como controle um soro de camundongo imunizado com Lc-13 (raia 5) e PBS-leite (raia 6). As posições de marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

Os AcMc anti-Lc-13 não reconheceram nem o antígeno bruto e nem o antígeno solúvel de amastigotas em quaisquer das condições de tratamento das amostras. Entretanto, identificaram uma banda dos antígenos de promastigotas de *L. chagasi* (Figura 8) de aproximadamente 60 kDa.

5.7 DETERMINAÇÃO DOS ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS DOS AcMc

Foram identificados como IgG1 os AcMc 10B4/6 e o 10D8, como IgG2a o 2C10D5, e confirmado como IgG2a o 5A9H8(H2) e, como IgM, o 11E8H7 (Quadro 1).

Quadro 1. Identificação das subclasses e isotipos dos novos anticorpos monoclonais produzidos e do 5A9H8(H2).

ANTICORPO	ANTÍGENO INJETADO NO DOADOR DOS ESPLÊNÓCITOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DOS AcMc	ISOTIPO
10B4/6	Lisado de <i>L. chagasi</i>	IgG1
10D8	Lisado de <i>L. chagasi</i>	IgG1
5A9H8(H2)	Promastigotas vivos	IgG2a
2C10D5	Lc-13	IgG2a
11E8H7	Lc-13	IgM

5.8 ELISA DE INIBIÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE *Leishmania*

Utilizando-se o AcMc 5A9H8, o mínimo de parasitos que pôde ser detectado em um ensaio de inibição de ligação de anticorpos foram 10^5 parasitos lisados, por poço de placa de microtitulação (Figura 9).

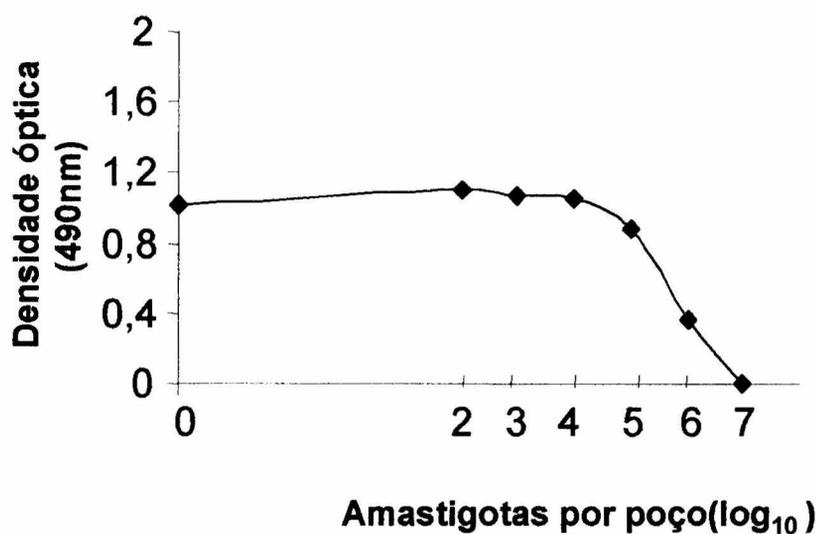
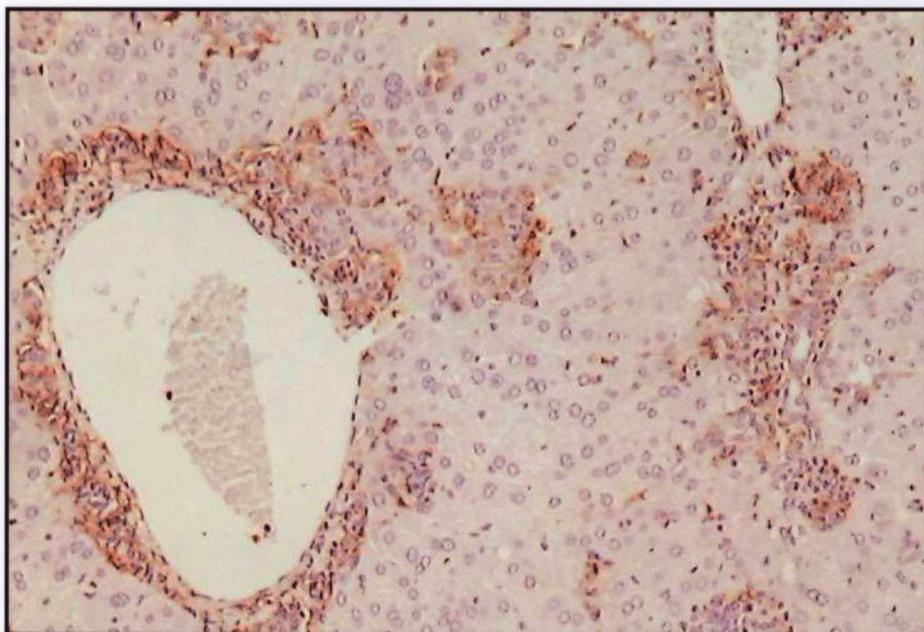


Figura 9. ELISA de inibição usando o AcMc 5A9H8(H2) pré-incubado com antígeno solúvel de amastigotas de *L. chagasi* correspondente a 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 0 amastigotas.

5.9 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE AMASTIGOTAS DE *L. chagasi*

Foi observada forte marcação com o AcMc 5A9H8 quando os cortes parafinados, imersos em tampão citrato, foram expostos ao calor, seja sob ação das microondas ou sob ação do vapor, como pode ser visto na Figura 10. Com este anticorpo pôde-se observar marcação em áreas sem parasitos inteiros, onde, provavelmente, encontravam-se antígenos degradados. Quando marcando *Leishmanias* inteiras, observou-se marcações também na porção interna da membrana dos vacúolos parasitóforos. Já com os AcMc 10D8 e 10B4/6 só foi vista marcação quando os cortes foram tratados com pronase, como mostrado na Figura 11. A marcação foi difusa, predominando nas regiões periportais e nos granulomas. Um soro de camundongo normal diluído a 1:1.500, não marcou qualquer estrutura.

A



B

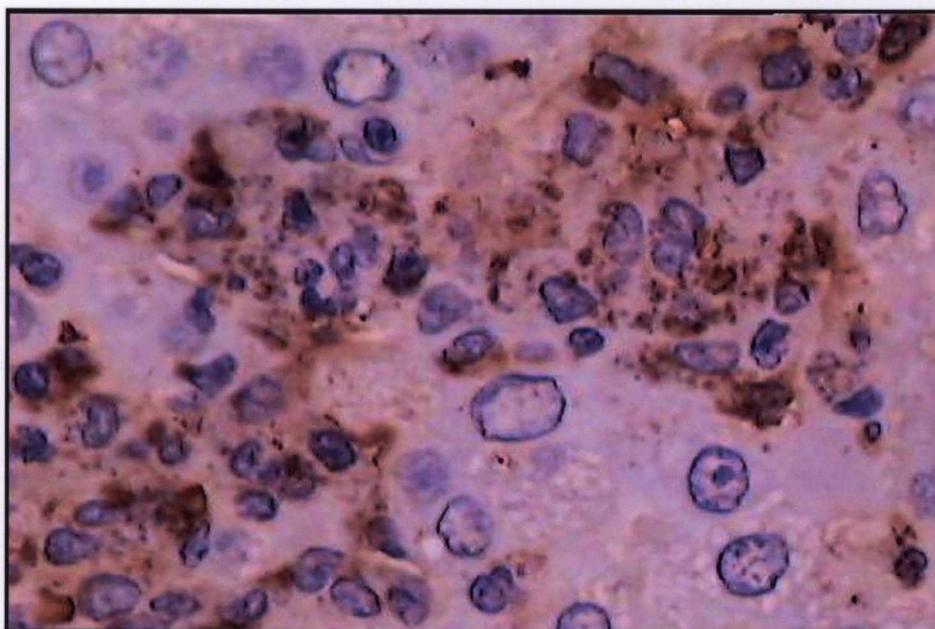
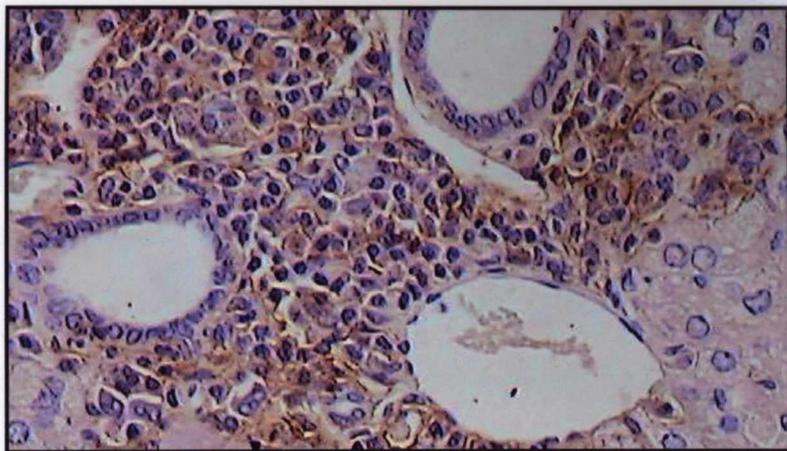
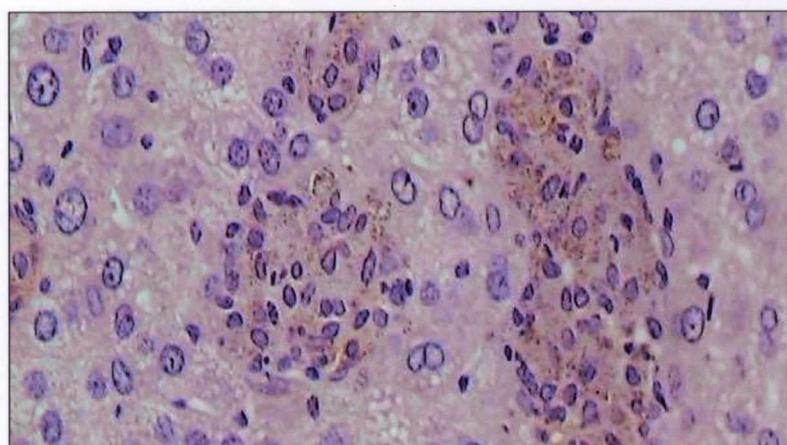


Figura 10. Imunohistoquímica em fígado de hamster infectado com *L. chagasi* utilizando como anticorpo primário o AcMc 5A9H8(H2), a diaminobenzidina como cromógeno e a hematoxilina como contra-corante. Os cortes de 4 μ m foram imersos em tampão citrato na etapa de exposição dos antígenos. **A.** Exposto a microondas (200X). **B.** Exposto ao vapor (400 X).

A



B



C

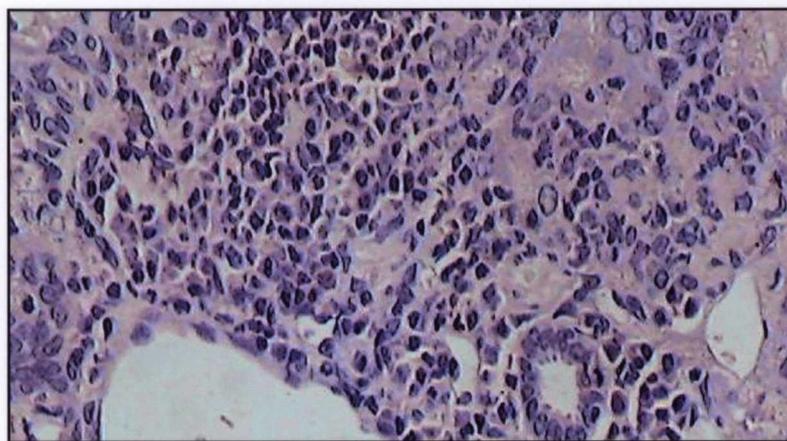


Figura 11. Imunohistoquímica em fígado de hamster infectado com *L. chagasi* utilizando DAB como substrato e contra-corado com hematoxilina. Os cortes de 4 μ m foram expostos a pronase. Aumento de 200X. **A.** AcMc 10B4/6. **B.** AcMc 10D8. **C.** Soro de camundongo normal.

Quando se usou os AcMc 2C10D5 e 11E8H7 não foi vista qualquer marcação, a não ser com o 11E8H7, onde se observou uma forte marcação de fundo quando a exposição foi feita através do calor ou da pronase (dados não mostrados). A exposição dos antígenos, através de tripsina, não proporcionou ao corte qualquer reação positiva com os AcMc, testados neste trabalho.

Já com os cortes congelados, repetiu-se a marcação dos AcMc 5A9H8, 10D8 e 10B4/6. Da mesma forma, os AcMc 2C10D5 e 11E8H7 proporcionaram marcação evidenciando bem a forma arredondada da *Leishmania*.

6 DISCUSSÃO

Aparentemente, não houve uma maior eficiência dos esplenócitos provenientes do camundongo imunizado com antígeno de *L. chagasi*, em comparação com as células oriundas do animal infectado com promastigotas vivos, com relação a capacidade de gerar hibridomas. Também, é evidente que não houve grandes diferenças de reatividade dos soros entre os dois grupos.

Não se pode descartar a hipótese de que, uma parte destes anticorpos detectados em ELISA, no soro dos animais imunizados com lisado de amastigotas sejam contra proteínas de hamster, já que os amastigotas foram purificados do fígado daqueles animais, e as placas foram sensibilizadas com amastigotas provenientes de baços destes animais. Nos camundongos imunizados através da infecção por promastigotas, não parece ter ocorrido uma grande apresentação efetiva de antígenos comuns às duas formas do parasito, já que a reatividade foi menos intensa quanto à presença de anticorpos anti-promastigota no soro e, antígenos de promastigotas, são seguramente imunogênicos para a linhagem de camundongo utilizada.

O grande número de clones em crescimento nas placas de cultivo resultantes da fusão de células de mieloma com esplenócitos dos imunizados com Lc-13, a maioria deles reativos contra *E. coli*, confirma que havia uma grande quantidade de linfócitos B, ativados nos baços, o que poderia resultar de uma grande imunogenicidade para os camundongos, do corpo de inclusão bacteriano, contendo Lc-13, utilizado nas imunizações. O ELISA (Figura 4) permitiu a determinação de que apenas dois clones que tinham reação específica para Lc-13, o que foi confirmado em *western-blot* (Figura 5).

O uso de antígenos não totalmente purificados para a imunização de animais é uma grande vantagem que a produção de AcMc possui, quando comparada com a produção de anticorpos policlonais (HAAHEIM, 1991; LADYMAN; RITTER, 1995). A especificidade pode ser obtida já na triagem inicial, porque muitas vezes não mais de um clone é encontrado por poço, e se pode desprezar em uma fase bem precoce os clones produzindo anticorpos que reagem com proteínas indesejáveis, o que diminui consideravelmente o volume de meio de cultura e o tempo gasto.

A estabilidade na produção de anticorpos é crucial para a utilização de um hibridoma. Uma possível solução para os clones, cujos sobrenadantes, em culturas subseqüentes, reduziram as suas reatividades frente a antígenos de amastigotas de *L. chagasi*, é a expansão e reclonagem das células "mãe" congeladas, já que a perda de reatividade com estes hibridomas pode ser devido ao crescimento de outros não produtores de anticorpos, ou seja, os clones reativos são eliminados por competição. Isto pode ocorrer devido a uma clonagem inadequada ou por mutação (GARDNER, 1985).

Os anticorpos 10B4/6 e 10D8, obtidos com a fusão de células de mieloma com esplenócitos de camundongos imunizados com lisado de amastigotas, reconheceram antígenos do mesmo peso molecular e são do mesmo isotipo de imunoglobulina, indicando que eles podem ser o mesmo anticorpo. Isto denota que pode ter havido contaminação de hibridomas entre os poços na placa de cultivo celular, durante os procedimentos de expansão de colônias ou troca de meio. Estes anticorpos são estágio-específicos, pois não reagiram com promastigotas de *L. chagasi* em *western-blot* (Figura 8).

Um fato inesperado foi o dos anticorpos 10B4/6 e 10/D8 não reconhecerem o antígeno solúvel e reconhecerem o antígeno bruto, quando estes tinham sido

submetidos a condições desnaturantes. Uma possível explicação para esse fato pode ser, simplesmente, decorrente de razões quantitativas. Haveria uma quantidade mais elevada dos antígenos reconhecidos pelo AcMc, no antígeno bruto, de modo que uma fração do antígeno que tivesse resistido à desnaturação ou renaturado, seria suficiente para o produto de uma reação visível, no caso de antígeno bruto e no caso de antígeno solúvel. Alternativamente, outras proteínas, carboidratos ou mesmo ácidos nucleicos presentes no antígeno bruto, poderiam proteger, pelo menos parcialmente, o antígeno reconhecido pelos AcMc da desnaturação.

Os AcMc 2C10D5 e 11E8H7 foram provenientes da fusão com células de camundongos imunizados com Lc-13, cujo gene foi clonado de uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. chagasi*, e codifica uma proteína de choque térmico. Possivelmente, este gene é pouco expresso em amastigotas, já que os AcMc não reconheceram qualquer banda dos antígenos brutos e solúveis de amastigotas de *L. chagasi*. Entretanto, ambos os AcMc detectaram uma banda protéica de promastigotas do mesmo parasito. É provável que o antígeno de *Leishmania* correspondente ao Lc-13 possui uma expressão mais significativa neste estágio da *Leishmania*.

Anticorpos monoclonais podem ser ferramentas apropriadas para a quantificação de antígenos parasitários, devido a homogeneidade e reprodutibilidade de obtenção, através dos anos, do mesmo anticorpo. Utilizando-se um AcMc em um ensaio de inibição de ligação, conseguiu-se detectar um mínimo de 10^5 parasitos. Esta sensibilidade pode ser ainda melhorada com a introdução dos outros AcMc produzidos neste trabalho. Melhores resultados podem ainda ser obtidos sensibilizando as placas de ELISA com antígenos recombinantes específicos,

buscados em bibliotecas de DNA, com o uso dos AcMc. Este trabalho se encontra em andamento com o AcMc 5A9H8.

Esta sensibilidade representada é pequena para permitir trabalhos experimentais, a exemplo dos que buscam avaliar a eficácia de vacinas, onde é desejável quantificação dos parasitos em diferentes tecidos (HILL et al., 1983; LIMA et al. em 1997).

O tipo de marcação do AcMc 5A9H8(H2) sobre amastigotas, na reação de imunoperoxidase sugere que os epitopos reconhecidos estão presentes na superfície do parasito. Esta afirmação deve-se ao padrão de marcação encontrado na *Leishmania* inteira, sobretudo quando estavam em vacúolos parasitóforos, onde havia também marcação na porção interna da membrana destes. A determinação precisa do sítio de ligação do AcMc, em nível sub-celular, pode ser confirmada por microscopia eletrônica, trabalho este que já está em andamento.

Os resultados na reação de imunoperoxidase em tecidos fixados em formalina com os AcMc 2C10D5 e o 11E8H7 confirmam a falta de reatividade destes AcMc em ELISA, quando se utilizou antígeno solúvel de amastigotas de *L. chagasi* e em *western-blot* quando se utilizou este antígeno e o bruto. Como esses AcMc reconhecem uma proteína de choque térmico é possível que, para evidenciar sua reatividade em amastigotas, estes devem ser expostos a alguma forma de estresse (por exemplo temperatura mais alta) que induzisse a expressão da proteína.

A reação inespecífica do anticorpo 11E8H7 sobre fígado de hamster pode ser reação do anticorpo secundário que foi usado, um anti-camundongo polivalente, pois o 11E8H7 é uma IgM. Diluir mais este anticorpo polivalente pode ser uma alternativa para reduzir o problema da marcação inespecífica.

Foi evidenciado que a exposição dos diferentes epitopos depende da metodologia empregada tanto no preparo dos cortes quanto para a exposição dos epitopos. O tecido, adequadamente congelado, conserva um número maior de determinantes antigênicos comparado com a fixação em formalina, apesar de que os cortes utilizados foram fixados nesta somente por um dia. Isto pôde ser evidenciado quando se usou os AcMc 2C10D5 e o 11E8H7 em tecidos congelados. Também, pode-se tentar outros fixadores como o etanol, que é relatado por AHRAM e col. (2003), como um bom preservador de proteínas. Paralelamente, pode-se lançar mão de procedimentos já padronizados para a obtenção dos AcMc em maiores concentrações que só estavam disponíveis na forma de sobrenadantes de cultura. Estas metodologias incluem as que já foram utilizadas para o AcMc 5A9H8, como indução de ascite em camundongos e posterior precipitação da mesma em sulfato de amônio.

Os AcMc reconheceram, claramente, formas amastigotas e restos parasitários nos tecidos infectados, não reconhecendo estruturas de tecido normais não associadas a formas amastigotas, indicando a especificidade dos mesmos para os antígenos de amastigotas. Em uma próxima etapa, esses monoclonais serão testados em tecidos normais, não infectados, de diferentes animais (seres humanos, cão, camundongo, rato e hamsters) para confirmar sua provável utilidade como reagentes capazes de aumentar a sensibilidade e facilitar a visualização de *Leishmania* infectando tecidos de mamíferos. No momento, já estão sendo realizados ensaios de imunocitoquímica com aspirados esplênicos de cães com leishmaniose visceral, onde os resultados preliminares, já sugerem sucesso.

7 CONCLUSÃO

- 1 A proteína Lc-13 recombinante é altamente imunogênica para camundongos
- 2 As imunizações, com o lisado de amastigotas e através de infecção por promastigotas, mostraram-se com eficiência comparável em termos tanto da indução de resposta humoral quanto no número de hibridomas totais e reativos proporcionados pela fusão com esplenócitos destes animais.
- 3 O AcMc contra antígenos recombinantes correspondente a uma proteína de choque térmico, não reconheceu antígenos preparados de amastigotas utilizados, de modo que sua possível utilização em quantificação de amastigotas dependeria, possivelmente, de um estágio prévio de estimulação de expressão dessa proteína, por exemplo, incubação da *Leishmania* a uma temperatura superior à ideal.
- 4 O AcMc 5A9H8 e os 10B4/6 e 10D8, que provavelmente são idênticos e reconhecem antígenos com peso molecular entre 47 e 57 kDa, foram capazes de identificar amastigotas através de imunohistoquímica em tecido parafinado fixado em formalina.
- 5 Os AcMc 2C10D5 e 11E8H7 somente reagiram com os amastigotas de *Leishmania* encontrados no tecido congelado.
- 6 A sensibilidade do ELISA de inibição com um AcMc anti-amastigota (5A9H8) foi de 10^5 parasitos / poço da placa de microtitulação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRAM, M.; FLAIG, M.J.; GILLESPIE, J.W.; DURAY, P.H.; LINEHAN, W.M.; ORNSTEIN, D.K.; NIU, S.; ZHAO, Y.; PETRICOIN, E.F.; EMMERT-BUCK, M.R. Evaluation of ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues for proteomic applications. **Proteomics**, **3**:413-421, 2003.
- ALENCAR, J. E. Leishmaniose visceral no Brasil. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, **17/18**:129-148, 1978.
- 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.
- ANDERSON, S.; DAVID, J.R.; MCMAHON-PRATT, D. In vivo protection against *Leishmania mexicana* mediated by monoclonal antibodies. **J. Immunol.**, **131**:1616-1618, 1983.
- ASHFORD, D.A.; DAVID, J.R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M.C.; SAMPAIO, D.P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Méd. Hyg.**, **59**:53-57, 1998.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, **30**:1269-1281, 2000.
- BAKER, E.Z.; BEIER, J.C.; MEEK, S.R.; WIRTZ, R.A. Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections in Thai-Kampuchean Anopheles (Diptera: Culicidae) by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Med. Entomol.**, **24**:536-541, 1987.
- BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. **Int. J. Parasitol.**, **29**:1137-1147, 1999.
- BEIER, J.C.; ONYANGO, F.K.; RAMADHAN, M.; KOROS, J.K.; ASIAGO, C.M.; WIRTZ, R.A.; KOECH, D.K.; ROBERTS, C.R. Quantitation of malaria sporozoites in the salivary glands of wild Afrotropical Anopheles. **Med. Vet. Entomol.**, **5**:63-70, 1991.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol.**, **28**:121-134, 1998.

BOGDAN, C.; GESSNER, A.; SOLBACH, W., ROLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Curr. Opin. Immunol.**, **8**:517-525, 1996.

BRASIL – Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/epi/pdfs/situacao_doencas.pdf>. Acesso em: 24 jan. 2003.

BRUCE, M.P.; BOYD, V.; DUCH, C.; WHITE, J.R. Dialysis- based bioreactor systems for the production of monoclonal antibodies - alternatives to ascites production in mice. **J. Immunol. Methods**, **264**:59-68, 2002.

BUALOMBAL, P.; THARAVANIJ, S.; KHUSMITH, S.; MALIKUL, S.; KETRANGSEE, S.; SANGRAI, P.; THAMMAPALERD, N. Competitive antibody binding inhibition ELISA for the detection of *Plasmodium falciparum* antigen. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, **21**:239-248, 1990; Erratum in: **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, **21**:514, 1991.

CERF, B. J.; JONES, T. C.; SAMPAIO, D.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON JUNIOR, W. D. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **156**:1030-1033, 1987.

CERQUEIRA, E. J. L. **O papel dos eqüídeos na ecologia da leishmaniose visceral no Estado da Bahia, Brasil**. 2001. 132 f. Tese (Doutorado em Patologia)- Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

CHANG, K.P. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science**, **12**:1240-1242, 1980.

CHANG, K.P.; MCGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Int. J. Parasitol.**, **29**:1137-1147, 2002.

CHULAY, J.D.; BRYCESON, A.D. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**:475-479, 1983.

COOK, D.B.; SELF, C.H. Monoclonal antibodies in diagnostic immunoassays. In: LADYMAN, H.M.; RITTER, A. M. (Eds.). **Monoclonal antibodies - Production, engineering and clinical application**. Cambridge: University press, 1995. cap. 2, p. 180-208.

COSTA, C.H.; PEREIRA, H.F.; ARAUJO, M.V. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. **Rev. Saúde Pública.**, 24:361-72, 1990.

COUTINHO, S.G.; DA-CRUZ, A.M.; BERTHO, A.L.; SANTIAGO, M.A.; DE-LUCA, P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31:139-142, 1998.

CUNHA, S.; FREIRE, M.; EULALIO, C.; CRISTOVAO, J.; NETTO, E.; JOHNSON, W. D.; REED, S. G.; BADARÓ, R. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche a major metropolitan area of Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 89:155-158, 1995.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 95:239-243, 2001. Review.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, 14:417-423, 1996.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETTO, A.; COREY, R. Effects of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, 25: 1240-1242, 1997.

DUSANIC, D.G. Applications of biotechnological methods to studies of protozoan parasites. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, 19:11-20, 1988.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. Canine leishmaniasis: an update. In: **PROC. INT. CANINE LEISH. FORUM**. Barcelona, Spain, 1999. p. 6-10.

FERRUA, B.; LE FICHOUX, Y.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; ROPTIN, C.; KUBAR, J. Quantitation of *Leishmania infantum* in tissues of infected BALB/c mouse by sandwich ELISA. **J. Immunoassay Immunochem.**, 22:165-181, 2001.

FORATTINI, O. P. **Entomologia médica**. Edgard Blucher, 1973. v. 4.

GALFRE, G.; MILSTEIN, C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. **Methods Enzymol.**, 73:3-46, 1981.

GARDNER, J.S.; CHIU, A.L.; MAKI, N.E.; HARRIS, J. F. A quantitative stability analysis of human monoclonal antibody production by heteromyeloma hybridomas, using an immunofluorescent technique. **J. Immunol. Methods**, **85**:335-346, 1985.

GARIN, Y.J.; SULAHIAN, A.; MENECEUR, P.; GANGNEUX, J.P.; PANNIER-STOCKMAN, C.; DEROUIN, F. Assessment of *Leishmania* promastigote growth in vitro by means of nucleoside hydrolase activity determination. **Parasitol. Res.**, **87**:145-148, 2001.

GEUS, B.; HENDRIKSEN, C.F.M. *In vivo* and in vitro production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives. **Res. Immunol.**, **149**:533-620, 1998.

GILLESPIE, J.W.; BEST, C.J.; BICHSEL, V.E.; COLE, K.A.; GREENHUT, S.F.; HEWITT, S.M.; AHAM, M.; GATHRIGHT, Y.B.; MERINO, M.J.; STRAUSBERG, R.L.; EPSTEIN, J.I.; HAMILTON, S.R.; GANNOT, G.; BAIBAKOVA, G.V.; CALVERT, V.S.; FLAIG, M.J.; CHUAQUI, R.F.; HERRING, J.C.; PFEIFER, J.; PETRICOIN, E.F.; LINEHAN, W.M.; DURAY, P.H.; BOVA, G.S.; EMMERT -BUCK, M.R. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. **Am. J. Pathol.**, **160**:449-457, 2002.

GONZALEZ, G.; SUNNEMARK, D.; ORN, A.; GRONVIK, K.O. Detection of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi* and its C-terminal extension in biological fluids during experimental infection in mice. **Scand. J. Immunol.**, **44**:122-128, 1996.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, **3**:230-250, 1993.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R.B., McMAHON-PRATT D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg.**;41(6):687-725, 1989.

HAAHEIM, L.R. Monoclonal antibodies-their diagnostic potential. **J. Hosp. Infect.**, **18**(Suppl A):443-450, 1991.

HALL, L.R.; TITUS, R.G. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **J. Immunol.**, **155**:3501-3506, 1995.

HANHAM CA, SHAW JJ, LAINSON R, MCMAHON-PRATT D. Production of a specific monoclonal antibody for the identification of *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **42**:453-459, 1990.

HANSEN, E.S.; KNUDSEN, J. Limitations in the use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for identification and quantification of thermogenin. **J. Immunol. Methods**, **77**:297-304, 1985.

HILL, J.O.; NORTH, R.J.; COLLINS, F.M. Advantages of measuring changes in the number of viable parasites in murine models of experimental cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, **39**:1087-1094, 1983.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, **25**:363-370, 2000.

HOMMEL, M.; ATTAR, Z.; FARGEAS, C.; DOURADO, C.; MONSIGNY, M.; MAYER, R.; CHANCE, M.L. The direct agglutination test: a non-specific test specific for the diagnosis of visceral leishmaniasis? **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **91**:795-802, 1997.

HU, X.S.; LIU, Q.; LIN, F.Q.; YI, T.L.; WANG, Y.J.; QIN, Z.; LUO, P.; WANG, L. Kala-azar infected serum circulating antigens and their characteristics detected by monoclonal antibody. **Chin. Med. J.**, **101**:1-6, 1988.

ISMAIL A, KHARAZMI A, PERMIN H, EL HASSAN AM. 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, 1997.

JAFFE, C.L.; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies specific for *Leishmania tropica*. I. Characterization of antigens associated with stage- and species-specific determinants. **J. Immunol.**, **131**:1987-1993, 1983.

JAFFE, C.L.; BENNETT, E.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MCMAHON-PRATT, D. Production and characterization of species-specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosis. **J. Immunol.**, **133**:440-447, 1984.

KENNER, J.R.; ARONSON, N.E.; BRATTHAUER, G.L.; TURNICKY, R.P.; JACKSON, J.E.; TANG, D.B.; SAU, P. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **J. Cutan. Pathol.**, **26**:130-136, 1999.

KHABIRI, A.R.; ALIMOHAMMADIAN, M.H.; BAGHERI, F. Isolation of a novel antigen from *Leishmania major* by monoclonal antibody for induction of DTH response in guinea pigs. **Acta Trop.**, **83**:S56, 2002. Suppl.1.

KHUSMITH, S.; INTAPAN, P.; THARAVANIJ, S.; TUNTRAKUL, S.; INDRAVIJIT, K.A.; BUNNAG, D. Two-site sandwich ELISA for detection of Plasmodium vivax blood stage antigens using monoclonal and polyclonal antibodies. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, **23**:745-751, 1992.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D.H.; RIOUX, J.A; LANOTTE, G.; LEANEY, A.J. Possible origins of *Leishmania chagasi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **74**: 563-565, 1980.

LADYMAN, H.M.; RITTER, A. M. Production of monoclonal antibodies. In: LADYMAN, H.M.; RITTER, A. M. (Eds.). **Monoclonal Antibodies - Production, engineering and clinical application**. Cambridge: University press, 1995. cap. 9, p. 9-33.

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W.; KILLICK, R. (Eds.). **The leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press., 1987. v. 1, 120 p.

LIMA, H.C.; BLEYENBERG, J.A.; TITUS, R.G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues infected animals. **Parasitol. Today**, **13**:80-83, 1997.

LOCKSLEY R.M., PINGEL S., LACY D., WAKIL A.E., BIX M., FOWELL D.J. Susceptibility to infectious diseases: *Leishmania* as a paradigm. **J. Infect. Dis.**, **179**(Suppl 2):S305-S308, 1999.

MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil - Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Públ.**, **10**(Suppl. 2):359-375, 1994a.

MATSUTSUMI, Y.; KAWAI, K.; NAGAKURA, K. Use of patients' sera for immunoperoxidase demonstration of infectious agents in paraffin sections. **Acta Pathol. Jpn.**, **41**:673-679, 1991.

- MOMEN, H.; GRIMALDI JUNIOR, G.; DEANE, L.M. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American Visceral Leishmaniasis (AVL)? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **82**:447-448, 1987.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, **18**:399-405, 2002.
- NASCIMENTO, M. D; COSTA J.M.; FIORI B.I.; VIANA G.M., FILHO M.S.; ALVIM A. C.; BASTOS O.C.; NAKATANI M.; REED, S.; BADARO, R.; SILVA, A.R.; BURATTINI, M.N. The epidemiological determinant aspects in the maintenance of visceral leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **29**(3):233-40, 1996.
- NICOLAS, L.; PRINA, E.; LANG, T.; MILON, G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. **J. Clin. Microbiol.**, **40**(5):1666-9, 2002.
- OLSON, W.C.; SPITZNAGEL, T.M.; YARMUSH, M.L. Dissociation kinetics of antigen-antibody interactions: studies on a panel of anti-albumin monoclonal antibodies. **Mol. Immunol.**, **26**:129-136, 1989.
- PANICHAKUL, T.; CHAWENKIRTTIKUL, R.; CHAIYAROJ, S.C.; SIRISINHA, S. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Penicillium marneffe* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **67**:443-447, 2002.
- PARANHOS-SILVA, M.; FREITAS, L. A. R.; SANTOS, W. C.; GRIMALDI JR., G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. A crosssectional serodiagnostic survey of canine leishmaniasis due *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **55**:39-44, 1996.
- PEARSON R.D., SOUSA A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, **22**:1-13, 1996.
- 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.

RAMOS, C.C.F.; DUARTE, M.I.S.; RAMOS, A.M.O. Leishmaniose visceral fatal associada à síndrome de imunodeficiência adquirida: relato de caso com achados necroscópicos e estudo imuno-histoquímico. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, **27**: 245-250, 1994.

RASSAM, M.B.; AL-MUDHAFFAR, S.A. The micro-ELISA sandwich technique for the quantitation of *Leishmania donovani* soluble antigen. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **74**:591-595, 1980.

RIOUX, J., A., LANOTTE, G., SERRES, E. Taxonomy of *Leishmania*. Use de isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, **65**:111-125, 1990.

ROY, G.; DUMAS, C.; SERENO, D.; WU, Y.; SINGH, A.K.; TREMBLAY, M.J.; OUELLETTE, M.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **110**:195-206, 2000.

RUITENBERG, E.J.; SOLANO-GALEGO, L.; MONEN, J.; PINELLI, E.; RUTTTEN, V. P. M. G. Immune response in canine leishmaniasis. In: SUMMARIES OF PRESENTATIONS AT THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM., 2001, Crete, Greece. **Anais...** Crete:ed.; 2001. p.32-36.

SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, **223**:1417-1419, 1984.

SALAH F, DEMERDASH Z, SHAKER Z, EL BASSIOUNY A, EL ATTAR G, ISMAIL S, BADIR N, EL DIN AS, MANSOUR M. A monoclonal antibody against *Schistosoma haematobium* soluble egg antigen: efficacy for diagnosis and monitoring of cure of *S. haematobium* infection. **Parasitol. Res.**, **86**:74-80, 2000.

SALINAS, G.; VALDERRAMA, L.; PALMA, G.; MONTES, G.; SARAIVA, N.G. Detección de amastigotas em leishmaniasis cutânea y mucocutanea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas com métodos convencionales de diagnóstico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **84**:53-60, 1989.

SCHANTZ, P.; STEURER, F.; JACKSON, J.; ROONEY, J.; AKEY, B.; DUPREY, Z.; BREITSCWERDT, E.; ROWTON, E.; GRAMICCIA, M. Emergence of visceral leishmaniasis in dogs in North America. In: SUMMARIES OF PRESENTATIONS AT THE INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM., 2001, Crete, Greece. **Anais...** Crete:ed.; 2001. p.4-11.

SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A.V.; SARTORI, A.; OLIVEIRA-NETO, M.P.; MATTOS, M.S.; ARAUJO, M.L.; SOUZA, W.J.; HADDAD, F.; PEREZ, M. DE A.; PACHECO, R.S.; MOMEN, H.; COUTINHO, S.G.; ALMEIDA, MARZOCHI M.C.; MARZOCHI, K.B.; DA COSTA, S.C. *Leishmanial* antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **96**:987-996, 2001.

SELLS, P.G.; BURTON, M. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **75**:461-468, 1981.

SINHA, R.; ARORA, S.K.; DATTA, U.; SEHGAL, S. Detection of *Leishmania* antigen in kala azar patients using monoclonal antibodies. **Microbiol. Immunol.**, **36**:391-400, 1992.

TAYLOR, D.R.; WILLIAMS, G.T. Differentiation and limited proliferation of isolated *Leishmania mexicana* amastigotes at 27^o C. **Acta Trop.**, **50**:141-150, 1992.

THIEL, M.; BRUCHHAUS, I. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. **Med. Microbiol. Immunol.**, **190**:33-36, 2001.

TORRENTERA, F.A.; LAMBOT, M.A.; LAMAN, J.D.; VAN MEURS, M.; KISS, R.; NOEL, J.C.; CARLIER, Y. Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **66**:273-279, 2002.

VAN-LIESHOUT, L.; DE-JONGE, N.; EL-MASRY, N.; MANSOUR, M.M.; BASSILY, S.; KRIJGER, F.W.; DEELDER, A.M. Monitoring the efficacy of different doses of praziquantel by quantification of circulating antigens in serum and urine of schistosomiasis patients. **Parasitology**, **108**(Pt5):519-26, 1994.

VICTOIR, K.; DUJARDIN, J.C. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. **Trends Parasitol.**, **18**:81-85, 2002.

WAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A.; MICHALICK, M.S.M. Immunotherapy as a treatment of American cutaneous leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. **Parassitologia**, 34:159-165, 1992.

WEIGLE, K.A.; DE DAVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAVIA, N.G.; D'ALESSANDRO, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 36:489-496, 1987.

WERNECK, G.L.; CRBINO, J.; COSTA, H.N. The spread of visceral leishmaniasis in space and time. **Acta Trop.**, 83(Suppl.1), 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. AIDS, leishmaniasis dangers of clash highlighted. **TDR News**, 36:1-11, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm>>. Acesso em: 08 abr.2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Third External Review -*UNDP/World Bank/WHO-Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases*- Final Report, 1998. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/exrev.pdf>> Acesso em: 08 abr. 03.

YOUNG, D. G.; DUNCAN, M. A. **Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomia* sand flies in Mexico, the west Indies, central and South America (Diptera: Psychodidae)**. Gainesville, FL: Associated Publishers, 1994.

ZERPA, O.; ULRICH, M.; NEGRON, E.; RODRIGUEZ, N.; CENTENO, M.; RODRIGUEZ, V.; BARRIOS, R.M.; BELIZARIO, D.; REED, S.; CONVIT, J. Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 94:484-487, 2000.

ZAKAI, H.A.; CHANCE, M.L.; BATES, P.A. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. **Parasitology**, 116:305-309, 1998.

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

ANEXO A

Short communication

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

Adriana M. Fróes², Márcia C. A. Teixeira^{1,3,4}, Cláudia V. D. dos Santos², Manoel L. Penha-Filho¹,
Geraldo G. Oliveira¹, Washington L. C. dos Santos^{1,4}, Lain C. Pontes-de-Carvalho^{1,4}, Neuza M.
Alcântara-Neves²

¹Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, nº 121, 40.295-001, Salvador, Bahia, Brasil. ²Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/nº, Canela, 40.110-100, Salvador, Bahia, Brasil. ³Laboratório de Saúde Pública Professor Gonçalo Moniz, SESAB, Rua Waldemar Falcão, nº 123, 40.295-001, Salvador, Bahia, Brasil. ⁴Fundação para Desenvolvimento da Ciência, AV Dom João VI, 275 Brotas, 40290000, Salvador, Bahia, Brasil.

Corresponding author: Neuza M. Alcântara-Neves

Mail adress: Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/nº, Canela, CEP – 40110-100, Bahia, Brasil.

Tel:5571-2458602/44; FAX:5571-2458917

E-mail address: neuza@ufba.br

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 with live 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.

Keywords

Immunization, *Leishmania chagasi*, Amastigotes, Antibodies.

Abbreviations

AVL American visceral leishmaniasis

IFA Incomplete Freud's adjuvant

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 (Lucena et al., 1996; Chakrabarty 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., 1984). However, it differs antigenically from the amastigote (Sadick et al., 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; Mansour et al., 1998; Hassan 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 (Magil et al., 1993; Jaffe et al., 1984; Anthony et al., 1985; Dabés Guimarães et al., 1996; Afrin and There, 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 responses 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.

Materials and methods

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. Amastigotes were obtained from the spleens of hamsters infected with 1×10^8 *L. chagasi* metacyclic promastigotes and purified by centrifugation on a Percoll solution gradient (Chang, 1980; Taylor and Williams, 1992). Lysates of both promastigote and amastigote forms were obtained by sonication (five cycles of 30 seconds with intermediate cooling cycles of 1 min at 80% output; Branson sonifier 450W, 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 ten *in vitro* culture passages.

2. Immunizations

Groups of four to ten 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 Freud'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 5×10^7 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 1×10^8 amastigote lysate emulsified in IFA or (b) five biweekly intravenous injections of 1×10^8 live *L. chagasi* metacyclic promastigotes.

Four dogs were initially immunized with two biweekly injections by the subcutaneous route, of promastigote lysate (1×10^8 parasites/animal) emulsified in IFA. Four weeks later, the same animals were infected by one subcutaneous injection of 1×10^8 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 eighth 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.

3. Clinical follow up of infected animals

After immunization with live metacyclic promastigote mice remained with sub-clinical infection for at least two 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.

4. Assessment of the antibody production

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) were coated by incubation with 2 µg of *L. chagasi* amastigote or promastigote lysates in 100 µl of 0,1 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). Positive and negative controls included in the plates were respectively sera from *L. chagasi* experimentally infected or non- infected mice, rabbits and dogs.

5. Hybridoma production

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 µg of amastigote lysate, the animals were sacrificed and their spleen cells submitted to fusion with SP2-0 mieloma cells, according to Jaffe et al (1984). The hybridomas obtained were screened for the production of anti-*Leishmania* antibodies, by testing the supernatants reactivity against *L. chagasi* amastigote antigens by ELISA. The positive clones were selected, expanded and stored for further analysis.

Results and 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, as assayed by ELISA. On the other hand, the sera of animals immunized 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), putting in evidence the antigenic differences between the two leishmanial forms. Sera from the negative control animals reacted only at back-ground levels with the tested *Leishmania*-antigens (not shown).

Regarding anti-amastigote monoclonal antibody production, the fusion of splenocytes from mice immunized with the amastigote lysate with mieloma cells generated four hybrid clones producing anti-*L. chagasi* amastigotes antibodies; the fusion carried out with the splenocytes from mice immunized with live metacyclic promastigotes generated two clones reacting with *L. chagasi* amastigotes (not shown). One of these clones was successfully used in an immunohistochemical assay to detect *L. chagasi* amastigotes in infected-hamster tissues and was considered stage-specific when tested by Western-blot (not shown). Thus, both immunizations protocols were effective in terms of allowing the production of anti-amastigote antibody-secreting hybridomas, and the fusion of splenocytes with mieloma cells could be performed using spleen cells from infected mice.

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* amastigotes. 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 (Streit et al., 2001; Oliveira et al., 1993) and rabbits seem to be completely refractory

to the infection (Rassan 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 alive 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. Although not shown in this paper, this immunization protocol was also useful for evaluation of the cellular immunity against *Leishmania chagasi* amastigotes in PBMC of dogs (Teixeira et al., manuscript in preparation).

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.
- Badaró, R., Reed, S.G., Barral, A., Orge, M.G., Jones, T.C., 1986. Evaluation of the micro enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to American Visceral Leishmaniasis:

standardization of parasite antigen to detect infection-specific responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35:72-78.

Brandonisio, O., Panaro, M.A., Sisto, M., Acquafredda, A., Fumarola, L., Leogrande, D., 2000. Interactions between *Leishmania* parasites and host cells. *Parassitologia.* 42(3-4):183-90.

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.* 82:632-5.

Chang, K. P., 1980. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science.* 12:1240-1242.

Dabés 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.

Flemmings, B.J., Pappas, M.G., Keenan, C.M., Hockmeyer, W.T., 1984. Immune complex decomplexation of canine sera for use in a complement-fixation test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33:553-559.

Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Bernal, T., Rodriguez, S., Pretell, E.J., Azcurra, 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):427-30.

Hassan, M.M., Medhat, A., Makhlof, M.M., Shata, T., Nafeh, M.A., Osman, O.A., Deaf, E.A., Galal, N., Fouad, 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.
- Hommel, M., Attar, Z., Fargeas, C., Dourado, C., Monsigny, M., Mayer, R., Chance, M.L., 1997. The direct agglutination test: a non-specific test specific for the diagnosis of visceral leishmaniasis? *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 91:795-802.
- 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, 13. *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.
- Kohler, G.; Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497.
- Lucena, R., Ginel, P.J., Lopez, R., Novales, M., Martin, 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): 711-27.

Marzochi, M.C., Coutinho, S.G., Sabroza, P.C., 1985. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro-Brasil. *Cad. Saúde Públ.* 1:432-446.

Millesimo, M.; Zucca, M.; Caramello, P.; Savoia, D., 1996. Evaluation of the immune response in visceral leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 26: 7-11.

Oliveira, G.G., Santoro, F., Sadigursky, M., 1993. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 88:243-8.

Paranhos-Silva, M., Nascimento, E.G., Melro, M.C., Oliveira, G.G., dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L.C., Oliveira-dos-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.

Quinnel, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.; Dye, C., 1997. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian, Brazil. *Parasitology*, 115:143-156.

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.

Reed, S.G., Shreffler, W.G., Burns, J.M., Scott, J.M., Orge, M.G., Ghalib, H.W., Siddig, M., Badaró, R., 1990. An improved serodiagnostic for visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43:632 -639.

Sadick, M.D., Raff, H.V., 1985. *Leishmania tropica*: differences in the antigenicity of promastigotes and amastigotes. *Cell Immunol.* 91(2):404- 14.

Singh, S., Gilman-Sachs, A., Chang, K.P., Reed, S.G., 1995. Diagnostic and prognostic value of k39 recombinant antigen in indian leishmaniasis. *J. Parasitol.*, 81:1000-1003.

Streit, 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. 166:1921-9.

Taylor, D.R., Williams, G.T., 1992. Differentiation and limited proliferation of isolated *Leishmania mexicana* amastigotes at 27^o 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):963-8.

Yamamoto, Y.I., Nunes, V.L.B, Rego, F.A., Oshiro, E.T., Dorval, M.E.M.C., 1988. Estudo da eficiência das reações de imunofluorescência e de hemaglutinação passiva no diagnóstico da leishmaniose visceral em cães. Rev. Fac. Med. Vet. Zoot., 25:143-152.

Legends to figures

Figure 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 the Material and Methods. Each line represents data obtained from the serum of an individual mouse, and graphs depict data from four to 10 animals.

Figure 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 the Material and Methods. Each line represents data obtained from the serum of an individual rabbit, and graphs depict data from four animals.

Figure 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 the Material and Methods. Each line represents data obtained from the serum of an individual dog, and graphs depict data from four animals.

