

PAULO HENRIQUE DA COSTA PINHEIRO

“A cisteína proteinase recombinante de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (rLdccys1): alvo para diagnóstico e imunização protetora de cães em área endêmica de leishmaniose visceral, Teresina/PI”

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências**

**São Paulo
2009**

PAULO HENRIQUE DA COSTA PINHEIRO

“A cisteína proteinase recombinante de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (rLdccys1): alvo para diagnóstico e imunização protetora de cães em área endêmica de leishmaniose visceral, Teresina/PI”

Orientadora: Profa. Dra. Clara Lúcia Barbiéri Mestriner

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências**

São Paulo

2009

Pinheiro, Paulo Henrique da Costa

“A cisteína proteinase recombinante de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (rLdccys1): alvo para diagnóstico e imunização protetora de cães em área endêmica de leishmaniose visceral, Teresina/PI”

/ Paulo Henrique da Costa Pinheiro. -- São Paulo, 2009.
xvii, 112f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Título em inglês: **A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* (rLdccys1): target for diagnosis and protective immunization of dogs in an endemic area of canine visceral leishmaniasis.**

1. *Leishmania (L.) chagasi*. 2. leishmaniose visceral canina. 3. rLdccys1. 4. imunização. 5. reação de hipersensibilidade tardia. 6. ELISA.

Trabalho realizado na Disciplina de Parasitologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP), com auxílios financeiros concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Faculdade NOVAFAP.

Aos meus pais, que me ensinaram os valores corretos da vida,

À minha esposa Adriana que soube superar nossos momentos de dificuldades e ausências,

Aos meus filhos Paulo Henrique e Ana Joice, que são a razão de minha felicidade,

Amo muito vocês!

À Dra. Clara Lúcia Barbiéri Mestriner pela orientação e confiança na continuidade desse trabalho, pelo exemplo de profissional e amizade demonstrada ao longo desses anos.

Aos animais de experimentação que viabilizaram a realização desse estudo. Sempre os tratamos com respeito.

Agradecimentos

À minha amiga Simone Katz, pelo bom relacionamento nesses anos, pelas horas de descontração e pelo trabalho com a expressão e purificação da rLdccys1. Muito obrigado.

À amiga Suzana Dias, pelas discussões científicas no início dessa jornada, pelo companheirismo nos anos que convivemos no laboratório e pelo fantástico trabalho com o gene *Ldccys1*, que abriu perspectivas para o desenvolvimento desse trabalho.

À Josie Haydeé pelo companheirismo e ajuda com a purificação da rLdccys1.

À minha Instituição de Ensino (Faculdade NOVAFAPI) pelo incentivo financeiro e moral ao longo dessa empreitada.

Ao amigo Érico Vinícius pelas discussões e convívio no laboratório.

À Dra. Ivete mendonça (LASAN-UFPI) pela ajuda no diagnóstico dos cães com LV, pela captura e colonização dos flebotomíneos e pela ajuda no desafio dos cães imunizados.

À Dra. Adriana Nunes Pinheiro pela abertura concedida no Laboratório de Técnicas Histológicas da Faculdade NOVAFAPI e pela ajuda no processamento das biópsias de tecidos dos cães submetidos aos testes de DTH.

Ao Carlão (NOVAFAPI) pela ajuda no processamento das peças histológicas.

Ao Cleiton Catarino (NOVAFAPI) pela extraordinária ajuda no transporte e manipulação dos cães desse experimento.

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa (UFPI) pela paciência na análise conjunta dos cortes histopatológicos dos testes de DTH.

Ao Prof. Dr. Paulo Pimenta (UFMG) pela abertura concedida em seu laboratório proporcionando meu treinamento para trabalhar com flebotomíneos.

Aos colegas Walter e Renata Baida, Esteban e Luciana, Daniella, Roberto, Rafael, Vanessa, Carol e Isabela, por propiciarem um bom ambiente de convívio no 6º andar.

À Profa. Dra. Nobuko Yoshida pela constante preocupação demonstrada com o andamento do trabalho. Tivemos conversas motivadoras.

Ao Dr. Michel Rabinovitch pela leitura crítica do paper.

Aos docentes da disciplina de Parasitologia: Dr. José Franco da Silveira e Dr. Renato Arruda Mortara pelo convívio nesses anos.

À Mércia e Regiane pela atenção e cordialidade com que sempre me trataram ao longo desses anos.

À Sandra, Adílson, Cidinha, Solange, Henrique e Lima pelo convívio e apoio técnico, sem os quais esse trabalho não seria possível.

A todos que, de alguma forma, se envolveram e me ajudaram.

Muito Obrigado!

“As idéias fundamentais da ciência podem ser expressas em linguagem
compreensível a todos”

Albert Einstein

Índice

Abreviaturas.....	001
Resumo.....	003
Introdução.....	006
1. Aspectos gerais das leishmanioses.....	007
2. Epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil.....	010
3. Respostas imunes na leishmaniose visceral canina.....	011
4. Antígenos de <i>Leishmania</i> como alvo para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.....	014
5. Antígenos de <i>Leishmania</i> utilizados em estudos de vacinação da leishmaniose visceral canina.....	016
6. Cisteína proteinases de <i>Leishmania</i>	018
Objetivos.....	022
Materiais e métodos.....	024
1. Descrição da área de estudo.....	025
2. Animais.....	026
3. Cultivo de promastigotas e obtenção de formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	027
4. Expressão e purificação da cisteína proteinase recombinante de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> (rLdccys1).....	028
5. Testes de ELISA.....	029
6. Ensaio de hipersensibilidade tardia (DTH).....	029
7. Imunização de animais com a rLdccys1.....	030
8. Obtenção de linfócitos do sangue periférico de cães imunizados com a rLdccys1.....	031
9. Ensaio de linfoproliferação.....	031
10. Dosagem de citocinas nos sobrenadantes das culturas de linfócitos.....	032
11. Imunização ativa dos cães com a rLdccys1 e desafio.....	032
11.1 Desafio dos cães imunizados com a rLdccys1 pela injeção intraperitoneal de amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	033
11.2 Desafio dos cães imunizados com a rLdccys1 pela picada de <i>Lutzomyia longipalpis</i>	033

11.2.1 Infecção das fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> pelo repasto sanguíneo em cães naturalmente infectados com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	034
11.2.2 Infecção das fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> por meio de alimentador artificial.....	036
12. Análise estatística.....	038
Resultados	039
1. Triagem dos cães para os testes de diagnóstico da LV por ELISA e DTH	040
2. Avaliação da antigenicidade da rLdccys1 em soro de cães com a LV.....	040
3. Determinação da sensibilidade e especificidade da rLdccys1 por ELISA.	042
4. Reatividade da rLdccys1 nas reações de hipersensibilidade tardia (DTH) em cães com leishmaniose visceral (LV).....	044
5. Correlação inversa entre os resultados de ELISA e DTH na leishmaniose visceral canina.....	048
6. Avaliação das respostas imunes desencadeadas em cães imunizados com a rLdccys1.....	049
7. Imunização ativa dos cães com a rLdccys1.....	051
7.1 Imunização dos cães com a rLdccys1 e desafio com a injeção intraperitoneal de amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	051
7.2 Imunização dos cães com a rLdccys1 e desafio pela picada de fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas com promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	055
7.2.1 Infecção dos flebotomíneos com a <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	055
7.2.2. Desafio com fêmeas de <i>Lutzomyia longipalpis</i> infectadas com <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	056
Discussão	060
Abstract	069
Referências bibliográficas	072
Anexo 1: Publicação	091

ABREVIATURAS

[³ H]-TdR	Metil-[³ H]-Timidina (Timidina tritiada)
μCi	microcurie
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
AcMo	anticorpo monoclonal
AM	extrato de amastigota
Amp	ampicilina
Ci	CURIE (1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ desintegrações/segundo)
cm	centímetro
cpm	contagens por minuto
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTH	Reação de Hipersensibilidade Tardia
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
<i>g</i>	aceleração da gravidade (9,8 m/s ²)
g	grama
h	hora
HEPES	4-2 Hidroxietil-1-ácido piperazinoetanosulfônico
IE	índice de estimulação
IFI	imunofluorescência indireta
IFN	interferon
IL	interleucina
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilodalton
Kg	quilograma
LB	Luria Bertani
LBamp	LB contendo ampicilina 100μg/mL
LV	Leishmaniose Visceral
M	molar
mA	miliampere

mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mV	milivolt
N	Normal
ng	nanograma
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
°C	grau Celsius
OD	densidade óptica
OPD	o-fenilenodiamina
ORF	open reading frame
PAGE-SDS	eletroforese em gel de acrilamida contendo SDS
PBS	salina em tampão fosfato 10 mM, pH 7,2
PBS-T	PBS Twin
PCR	reação de polimerase em cadeia
pg	picograma
r	coeficiente de correlação de Pearson
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
seg	segundo
T.A.	temperatura ambiente
Th	linfócito T “helper”
Tris	Tris [hidroximetilaminometano]
U	unidade
V	volt
v	volume

RESUMO

Uma cisteína proteinase recombinante, rLdccys1, obtida pela expressão do gene *Ldccys1* de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em sistema bacteriano, foi utilizada em ensaios de imunodiagnóstico por ELISA e DTH em cães de uma região endêmica de leishmaniose visceral (LV), Teresina, Piauí. A rLdccys1 também foi utilizada para a imunização de cães e a avaliação da possível proteção dos animais imunizados contra o desafio com a *L. (L.) chagasi*.

Os ensaios por ELISA dos soros de cães com LV mostraram que a sensibilidade para a detecção de anticorpos anti-*L. (L.) chagasi* utilizando a rLdccys1 e os extratos de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) chagasi* foi de 98%, 86% e 89%, respectivamente. A rLdccys1 não apresentou reatividade cruzada com os soros de cães com doenças comuns nas regiões endêmicas de LV, tais como erliquiose, babesiose e doença de Chagas e a especificidade dos ensaios de ELISA utilizando-se a rLdccys1 e os extratos de amastigotas e promastigotas de *L. (L.) chagasi* foi de 96%, 69% e 68%, respectivamente.

As respostas de DTH foram avaliadas nos cães após a injeção subcutânea da rLdccys1 ou do extrato dos amastigotas de *L. (L.) chagasi*. Todos os cães assintomáticos apresentaram resposta de DTH positiva à rLdccys1 com a formação de nódulos em torno de 10 mm 48 horas após a injeção do antígeno, enquanto que os cães sintomáticos não apresentaram reatividade significativa à rLdccys1 nos ensaios de DTH. As respostas de DTH foram mais intensas quando se utilizou a rLdccys1 comparadas às observadas com o extrato dos parasitas. A análise histológica mostrou áreas de necrose e hemorragia nos nódulos induzidos pelo extrato dos parasitas e reação granulomatosa típica, com predomínio de células mononucleares, nos cortes dos nódulos induzidos pela rLdccys1. A análise dos dados obtidos nos ensaios de ELISA e DTH realizados com a rLdccys1 e os extratos de amastigotas de *L. (L.) chagasi* mostrou a correlação inversa entre as respostas humoral e celular no desencadeamento da LV canina.

As respostas celulares induzidas nos cães pela rLdccys1 foram avaliadas após a imunização dos animais com o antígeno recombinante juntamente com a *Propionibacterium acnes*. Os linfócitos de sangue periférico dos cães imunizados com a rLdccys1 + *P. acnes* apresentaram significantes índices de estimulação quando reestimulados *in vitro* com a rLdccys1 ou o extrato dos amastigotas de *L. (L.) chagasi*. A dosagem de citocinas nos sobrenadantes dessas culturas mostrou

a secreção de níveis significantes de IFN- γ , enquanto IL-10 não foi detectada.

Nos experimentos em que cães foram imunizados com a rLdccys1 + *P. acnes* e desafiados com a injeção intraperitoneal de 1×10^4 amastigotas isolados de cão infectado com a *L. (L.) chagasi* 3 de 4 animais sobreviveram dez semanas após o desafio, enquanto que os animais controles que receberam PBS e *P. acnes* morreram em no máximo 4 e 6 semanas, respectivamente, após o desafio. Nos cães imunizados com a rLdccys1 o número de amastigotas de *L. (L.) chagasi* foi significativamente reduzido no baço, fígado e medula óssea comparado ao observado nos controles. A dosagem sérica de IFN- γ nos animais imunizados com a rLdccys1 mostrou a secreção significante dessa linfocina, enquanto que níveis basais de IL-10 foram detectados.

Todos os cães imunizados com a rLdccys1 e desafiados pela picada das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* sobreviveram até dezesseis semanas após o desafio e os animais controles injetados com PBS e *P. acnes* morreram sete e nove semanas, respectivamente, após o desafio. Os cães controles apresentaram número significante de amastigotas de *L. (L.) chagasi* no fígado e baço, porém nos animais imunizados com a rLdccys1 nenhum parasita foi observado. No grupo imunizado com a rLdccys1 houve aumento crescente dos níveis séricos de IFN- γ durante a imunização que atingiu um pico uma semana após o desafio, enquanto que a concentração de IL-10 foi mantida em níveis basais.

Os dados do presente trabalho mostraram o potencial da rLdccys1 de *L. (L.) chagasi* para o diagnóstico e a imunoprevenção da LV canina, abrindo perspectivas para a imunização dos cães em larga escala nas regiões endêmicas de LV e a avaliação do impacto da proteção conferida nos animais imunizados na incidência da doença.

1. Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses compreendem um grupo de parasitoses causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Estima-se que existam atualmente 12 milhões de casos de leishmanioses, com mortalidade anual de aproximadamente 60.000. Segundo a Organização Mundial de Saúde, as leishmanioses ocorrem em 88 países e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles. Anualmente surgem 2 milhões de novos casos e 350 milhões de pessoas encontram-se sob o risco de adquirir alguma forma da doença (WHO, 2007). A coinfeção *Leishmania*/HIV agrava ainda mais esse quadro, considerando-se o número de pessoas HIV positivas (Desjeux e Alvar, 2003).

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e compreende parasitas digenéticos que se desenvolvem alternadamente em hospedeiros vertebrados mamíferos e insetos vetores. Nos hospedeiros mamíferos, entre eles o homem, os parasitas assumem a forma amastigota, arredondada e imóvel, que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário em um vacúolo parasitóforo. À medida que os amastigotas se multiplicam por divisão binária os macrófagos se rompem liberando os parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. Os vetores das leishmanioses são representados por insetos dípteros da sub-família Phlebotominae (gênero *Lutzomya* nas Américas e *Phlebotomus* no Velho Mundo). Nos flebotomíneos os parasitas vivem no sistema digestivo onde as formas amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo se diferenciam em promastigotas, formas alongadas, móveis e flageladas que são regurgitadas na pele dos mamíferos durante a picada, completando o ciclo.

As várias formas clínicas das leishmanioses dependem da espécie do parasita, carga genética do hospedeiro e imunidade adquirida durante o desenvolvimento da doença. As formas cutâneas, caracterizadas por lesões de pele, são causadas por espécies pertencentes aos complexos *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* nas Américas [*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* no Brasil] e ao complexo *Leishmania* (*Leishmania*) *tropica* no Velho Mundo [*L. (L.) tropica* e *L. (L.) major*, entre outras]. A forma cutânea difusa, que apresenta lesões crônicas e

disseminadas, no Brasil é causada pela *L. (L.) amazonensis*, enquanto que o agente da leishmaniose mucocutânea, forma invasiva e mutilante, é a *L. (V.) braziliensis* em nosso país. A forma visceral, também conhecida como calazar, é causada por espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* [*L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi* nas Américas]. *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* são atualmente consideradas uma única espécie devido às suas semelhanças genotípicas e à epidemiologia da leishmaniose visceral nas Américas e nos países do Mediterrâneo (Mauricio et al, 2000).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica, debilitante, caracterizada pelo tropismo do parasita pelo sistema mononuclear fagocítico do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides. A infecção causada pelas espécies visceralizantes de *Leishmania* caracterizam-se por episódios febris, hepatoesplenomegalia grave, emagrecimento, anemia, micropoliadenia, podendo ocorrer manifestações intestinais e fenômenos hemorrágicos (Carvalho et al, 1992). A doença apresenta um caráter consumptivo que pode levar à morte se não tratada precocemente (Badaró et al, 1986).

No Brasil a principal espécie de flebotomíneo envolvida na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral é *Lutzomyia longipalpis* e o cão, a raposa e o homem participam da sua cadeia de transmissão. Entre esses hospedeiros vertebrados, os cães atuam como os principais reservatórios da doença, pois esses animais apresentam concentração de *Leishmania* na pele cerca de cinco vezes maior que os humanos infectados (Costa et al, 1990). Esse aspecto da infecção em cães parece ser determinante para o papel desses animais como os principais reservatórios domésticos da leishmaniose visceral, tendo-se demonstrado que a infecção experimental dos flebotomíneos pela picada de cães infectados é três vezes maior à observada pela picada de indivíduos doentes (Costa et al, 2002). Embora não seja conhecido o número de raposas (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) que habitam as áreas endêmicas de leishmaniose visceral, esses canídeos também apresentam abundante parasitismo cutâneo e representam os principais reservatórios silvestres da LV. A Figura 1 ilustra o ciclo evolutivo da *L. (L.) chagasi* destacando-se os principais reservatórios da LV no Brasil.

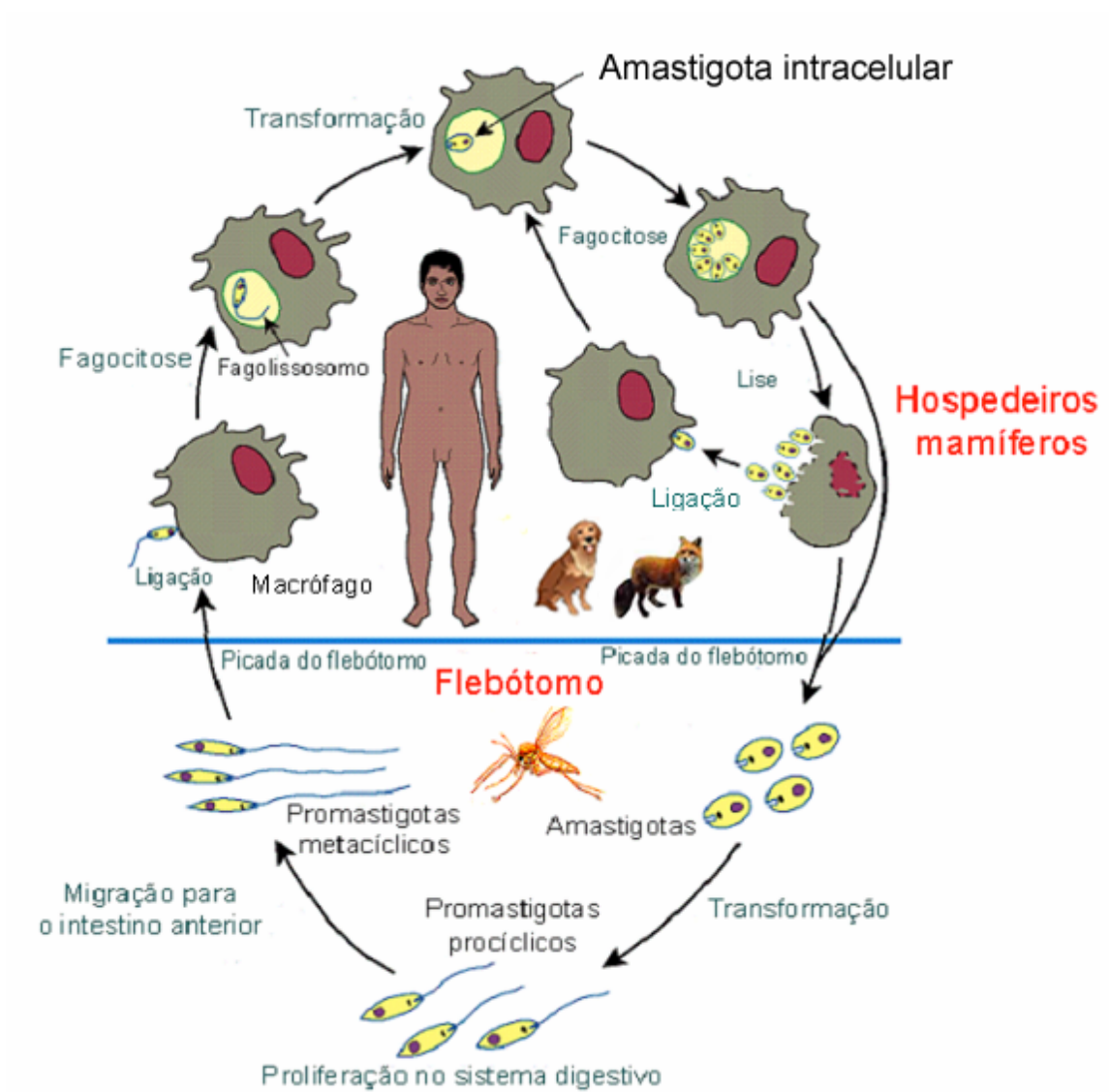


Figura 1: Ciclo evolutivo da *Leishmania (L.) chagasi*

2. Epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde e a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA, 2002) tem havido um aumento da incidência da LV em diversas regiões do mundo. Até o início dos anos 90, no Brasil, registravam-se em média anualmente cerca de 1.500 casos novos. Porém, nos últimos anos, a incidência tem sido superior a 2.500 casos novos anuais. Surtos esporádicos dessa parasitose constituem uma indicação de que a doença permanece como uma ameaça constante em termos de saúde pública.

A LV atinge 22 estados brasileiros principalmente os das regiões Nordeste e Centro-Oeste, onde se concentram mais de 72% dos casos (SINAN/Ministério da Saúde, 2008). Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde), dos 5.521 municípios brasileiros 1.638 apresentam casos registrados de LV, sendo 173 classificados como de transmissão moderada e 197 de transmissão intensa (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005).

A redução de animais silvestres que servem de alimento para as fêmeas de *Lu. Longipalpis*, causada pelo desmatamento descontrolado no perímetro urbano das cidades, posicionou o homem e o cão como alternativas mais acessíveis ao inseto, urbanizando a doença e contribuindo para a endemidade da LV nessas áreas (Costa et al, 1990; Tesh, 1995). Além disso, o comportamento da LV em áreas endêmicas é sazonal, principalmente devido a variações climáticas caracterizadas pelo fenômeno El Niño (Franke et al, 2002). Tais modificações levaram a um aumento dramático da incidência da LV nessas áreas.

Teresina viveu entre 1981 e 1985 o primeiro surto epidêmico de LV com mais de 1.000 novos casos da doença registrados em uma população média de 400.000 habitantes (Costa et al, 1990). Em 1992 um novo surto epidêmico teve início e 1.200 novos casos foram registrados em uma população de 650.000 habitantes (Werneck et al, 2002).

Esses dados revelam que o grande número de casos existentes, o alto índice de morbidade e mortalidade e o fato de a LV representar uma parasitose cuja incidência está aumentando, tornam essa infecção um grande desafio de saúde pública. As estratégias de controle da doença empregadas até o momento no Brasil baseiam-se no tratamento dos pacientes, combate aos vetores e principalmente no sacrifício dos cães, pois eles representam o principal

reservatório urbano da LV no Brasil e não respondem ao tratamento convencional da doença. A eficácia dessas medidas, no entanto, tem esbarrado em vários problemas: a toxicidade dos medicamentos disponíveis para o tratamento da doença humana; a necessidade de desenvolver inseticidas mais eficazes e menos tóxicos para a eliminação dos vetores; a importância de maior investimento em pesquisa da epidemiologia da LV para a detecção de outros animais que possam representar fontes de infecção da *L. (L.) chagasi*.

O combate aos cães como medida de controle do calazar envolve dois sérios problemas: a baixa eficiência dos testes sorológicos para o diagnóstico da doença nesses animais (Costa e Vieira, 2001) e os conflitos que se criam entre os proprietários e os agentes de saúde pública para a eliminação dos cães doentes. Além disso, o sacrifício dos cães representa uma medida ineficaz, pois não inibe a reintrodução de novos animais nas áreas endêmicas (Dietze et al, 1997; Marzochi, 1985). Os problemas apontados quanto à epidemiologia e controle do calazar demonstram a importância da pesquisa e caracterização de novos antígenos com potencial para o diagnóstico e para a indução de respostas imunes protetoras nos cães.

3. Respostas imunes na leishmaniose visceral canina

A evolução da LV nos cães é muito variável, pois os animais infectados com a *L. (L.) chagasi* podem desenvolver doença sintomática que resulta na morte do animal, enquanto que outros permanecem assintomáticos ou desenvolvem sintomas leves. O espectro clínico da LV sintomática compreende linfadenopatia, anemia, diarreia, alopecia, dermatite, onicogribose, perda de peso, caquexia, problemas locomotores, conjuntivite e epistaxe (Ciaramella et al, 1997). A LV canina sintomática é associada com mudanças imunológicas envolvendo os linfócitos T. Essas mudanças compreendem a ausência de resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) aos antígenos de *Leishmania* (Pinelli et al, 1994; Cardoso et al, 1998; Solano-Gallego et al, 2000), a diminuição do número de linfócitos T no sangue periférico (Pinelli et al, 1994; Martinez-Moreno et al, 1995; De Luna et al, 1999) e a ausência da produção *in vitro* de IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos do sangue periférico dos cães doentes (Pinelli et al, 1994; Pinelli et al, 1995; Pinelli et al, 1999; Santos-Gomes et al, 2002). Além disso, altos

títulos de imunoglobulinas anti-*Leishmania* não imunoprotetoras são detectados nos animais sintomáticos (Abranches et al, 1991; Pinelli et al, 1994; Martinez-Moreno et al, 1995). Por outro lado, a resistência na LV canina está associada à ativação de linfócitos Th1 produtores de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (Pinelli et al, 1994; Pinelli et al, 1995). O principal mecanismo protetor envolvido com as respostas imunes protetoras em cães infectados com *L. (L.) infantum* é a ativação de macrófagos pelo IFN- γ e TNF- α que destrói os amastigotas intracelulares via a síntese de óxido nítrico (NO), como foi observado após a quimioterapia bem sucedida de cães infectados com a *L. (L.) infantum* (Vouldoukis et al, 1996). A produção de NO e atividade leishmanicida foram também detectadas em uma linhagem de macrófagos caninos infectados com a *L. (L.) infantum* após a incubação com IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Pinelli et al, 2000), assim como em macrófagos de cães imunizados com promastigotas mortos de *L. (L.) infantum* (Panaro et al, 2001). O papel da IL-12 na indução e manutenção da resposta do tipo Th1 tem sido escassamente estudado na LV canina. A expressão simultânea de IL-12p40, além de mRNA de IL-2 e IFN- γ , foi temporariamente observada em cães experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum*, indicando o envolvimento dessas citocinas no retardo da doença nesses animais (Santos-Gomes et al, 2002). A IL-12 aumentou a produção de IFN- γ pelos linfócitos periféricos de cães com LV sintomática e essa citocina foi detectada em culturas de linfócitos isolados de linfonodos de cães imunizados com o DNA do antígeno LACK e protegidos contra o desafio com *L. (L.) infantum* (Ramiro et al, 2003). Resultados semelhantes têm sido mostrados com a IL-18 (Quinnell et al, 2001; Chamizo et al, 2005).

O papel das citocinas do tipo Th2 não foi definido na LV canina. A indução de respostas mistas Th1 e Th2 foi demonstrada em culturas de linfócitos periféricos de cães com LV assintomática em que foram detectados mRNAs de IL-2, IFN- γ e IL-10. Apesar de haver predomínio de IL-2 e IFN- γ nos cães assintomáticos, o desenvolvimento da doença sintomática não foi correlacionado com a expressão de IL-10 (Santos-Gomes et al, 2002; Chamizo et al, 2005). Por outro lado, mRNA de IL-10 foi detectado em linfócitos periféricos de cães com LV sintomática estimulados pela Concanavalina A (Pinelli et al, 1999). Corroborando esses resultados, foi demonstrada a secreção de altos níveis de IL-10 por

linfócitos periféricos de cães com LV sintomática induzidos pela cisteína proteinase recombinante de *L. (L.) chagasi* (rLdccys1), contrastando com a baixa e não detectável concentração dessa citocina em sobrenadantes das culturas dos linfócitos isolados dos cães oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente (Pinheiro et al, 2005). Transcritos de IL-10 foram também detectados em linfócitos periféricos de cães infectados 12 meses após o desafio com *L. (L.) infantum*. Por outro lado, os animais vacinados com as cisteína proteinases I e II de *L. (L.) infantum* e não infectados apresentaram concentração aumentada de mRNA de IFN- γ (Rafati et al, 2005). A secreção de IL-10 pelas células T regulatórias CD25⁺CD4⁺ tem sido implicada na LV humana e murina, porém na LV canina o envolvimento dessas células não tem sido explorado. O mRNA de IL-4 não foi detectado em linfócitos periféricos recém-isolados de cães com LV assintomática, embora IL-4 tenha sido detectada em cães assintomáticos estimulados com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) (Chamizo et al, 2005). Em cães sintomáticos foi detectado mRNA de IL-4 em linfócitos periféricos estimulados por mitógeno (Pinelli et al, 1999) e em aspirados de medula óssea de cães com sintomas severos de LV (Quinnell et al, 2001). Níveis significantes de IL-4 foram detectados no sobrenadante de linfócitos periféricos de cães sintomáticos estimulados com a cisteína proteinase de *L. (L.) chagasi*, enquanto que essa citocina não foi detectada nos sobrenadantes dos linfócitos dos animais assintomáticos e oligossintomáticos estimulados por esse antígeno (Pinheiro et al, 2005).

IgG1 e IgG2 têm sido utilizadas como um indicador mais adequado da LV canina do que a IgG total (Deplazes et al, 1995). A correlação direta entre a indução de altos níveis de IgG1 anti-*Leishmania* e o aparecimento dos sintomas clínicos foi demonstrada em cães infectados com *L. (L.) infantum*, enquanto que IgG2 foi associada com a infecção assintomática (Nieto et al, 1999). Entretanto, esses resultados não são corroborados por outros estudos nos quais cães com reação de DTH positiva mostraram resposta imune humoral polimórfica variando de níveis séricos negativos a positivos de IgG1 ou IgG2 (Bourdoiseau et al, 1997; Solano-Gallego et al, 2000). Alta concentração de IgG2 foi encontrada em cães sintomáticos (Leandro et al, 2001) e o aumento de todas as subclasses de IgG foi demonstrado em cães naturalmente infectados no Brasil (Quinnell et al, 2003). Dados mais recentes mostraram a alta expressão de IgE, além de IgG1, nos cães

sintomáticos de diferentes áreas endêmicas, abrindo perspectivas ao seu potencial uso como marcador da LV ativa (Almeida et al, 2005; Iniesta et al, 2005).

O envolvimento dos linfócitos CD8⁺ na resistência à LV canina também tem sido demonstrado. Esses linfócitos foram detectados em cães assintomáticos experimentalmente infectados com *L. (L.) infantum*, porém não nos animais sintomáticos, sugerindo que a lise direta dos macrófagos infectados com a *L. (L.) infantum* pelos linfócitos T citotóxicos representa um mecanismo efetor adicional de resistência na LV canina (Pinelli et al, 1995). Em cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* foi observada a redução das populações de CD4⁺ e CD8⁺ e a repopulação dessas células após o tratamento (Bourdoiseau et al, 1997). Embora não diretamente demonstrado, o envolvimento de linfócitos CD8⁺ na LV canina foi sugerido por dois estudos em que os cães foram imunizados com o DNA codificador do antígeno LACK ou o DNA codificador das cisteína proteinases CPA e CPB de *L. (L.) infantum* (Ramiro et al, 2003; Rafati et al, 2005). Em cães naturalmente infectados com a *L. (L.) chagasi* assintomáticos e naqueles com baixa carga de parasitas foi detectado o predomínio de linfócitos CD8⁺, indicando a correlação com a proteção natural nesses animais (Reis et al, 2006). O aumento de linfócitos CD8⁺ foi observado em cães infectados com a *L. (L.) chagasi* e tratados com o ligante de fucose e manose de *L. (L.) donovani* (FML), assim como em cães imunizados com esse antígeno (Araújo et al, 2009). A expressão aumentada de linfócitos CD8⁺ também foi detectada em cães imunizados com o lisado de *L. (V.) braziliensis* e saponina (Giunchetti et al, 2008).

4. Antígenos de *Leishmania* como alvo para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina

As técnicas de diagnóstico da LV canina baseadas na detecção dos parasitas a partir de material retirado da medula óssea ou do baço são invasivas e de sensibilidade relativamente baixa (Schallig et al, 2002). Os métodos sorológicos de diagnóstico disponíveis compreendem os testes de aglutinação direta, imunofluorescência indireta e ELISA (revisto por Gomes et al, 2008). Na maior parte desses ensaios os extratos brutos de *Leishmania* são utilizados como antígenos, o que limita a especificidade desses testes pela ocorrência de reações

cruzadas principalmente com doença de Chagas, erliquiose, riquetsiose, toxoplasmose e babesiose (El-Amin et al, 1986; Harith et al, 1987; Barbosa de Deus et al, 2002). A especificidade dos testes sorológicos tem aumentado pela utilização de antígenos de *Leishmania* purificados ou recombinantes e vários desses antígenos têm se mostrado úteis para o diagnóstico da LV canina. O antígeno A2, expresso predominantemente nos amastigotas de *Leishmania* e descrito primeiramente em *L. (L.) donovani*, mostrou muita especificidade para o diagnóstico do calazar canino e bons resultados também na identificação de cães com LV assintomática (Carvalho et al, 2002; Porrozzi et al, 2007). A utilização em ensaios de ELISA da proteína recombinante rK39, específica para todas as espécies pertencentes ao complexo *L. (L.) donovani*, resultou em 97,1% de sensibilidade e 98,8% de especificidade para o diagnóstico de cães com LV na Itália e Estados Unidos (Badaró et al, 1986; Scalone et al, 2002; Nascimento et al, 2005). O complexo ligante de fucose e manose (FML) de *L. (L.) donovani* foi utilizado em ensaios de ELISA, demonstrando-se que ele apresenta alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LV canina (Borja-Cabrera et al, 1999). A utilização da proteína quimérica PQ em testes de ELISA com soros de cães com LV isolados de duas regiões diferentes da Espanha mostrou sensibilidade de 79 a 93% e especificidade de 96 a 100% (Soto et al, 1998). Outros antígenos recombinantes utilizados em diagnóstico são as proteínas de choque térmico HSP70, um marcador útil para todas as formas da LV canina (Nieto et al, 1999), e HSP83 (Angel et al, 1996), a histona H3 associada com a progressão da doença (Soto et al, 1996), as frações de 14 e 16 kDa de *L. (L.) infantum* (Rami et al, 2005) e as cisteína proteinases I e II de *L. (L.) infantum* (Rafati et al, 2003).

Os testes de hipersensibilidade do tipo tardio podem ser utilizados para o diagnóstico clínico e estudos epidemiológicos da LV humana, pois é negativo na vigência da doença, porém torna-se e permanece positivo após a resolução dos sintomas clínicos (Pearson e Souza, 1996). A extensão desse teste para a LV canina mostrou que ele é útil para estudos epidemiológicos em áreas endêmicas da doença e como marcador potencial da imunidade celular em cães infectados com a *L. (L.) chagasi* (Pinelli et al, 1994). Além disso, o diagnóstico das formas clínicas da LV canina constitui um parâmetro importante para o controle da doença nesses animais, pois cerca de 3 de 7 cães infectados com *Leishmania*

podem não apresentar os sinais e sintomas da LV (Abranches et al, 1991), mas são capazes de infectar o vetor (Alvar et al, 1994; Molina et al, 1994). Assim, o teste cutâneo da leishmanina constitui ainda o método de escolha para avaliar respostas de DTH específicas em cães nas regiões endêmicas de LV (Cardoso et al, 1998; Fernández-Bellon et al, 2005; Baleeiro et al, 2006). Nas reações de DTH são utilizados extratos de promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* e antígenos recombinantes não têm sido testados nessas reações. Entretanto, dependendo da área endêmica de LV os antígenos utilizados podem interferir com a especificidade desses testes (Baleeiro et al, 2006), além da ocorrência de reações secundárias no local de aplicação dos antígenos em função da dose administrada (Weigle et al, 1991).

5. Antígenos de *Leishmania* utilizados em estudos de vacinação da leishmaniose visceral canina

Alguns antígenos capazes de desenvolver resposta imune mediada por células Th1 e produção de IFN- γ vêm sendo estudados na vacinação contra a LV canina. O complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose (FML) de *Leishmania (L.) donovani* induziu um efeito protetor forte e duradouro contra a LV canina em uma área endêmica no Brasil (São Gonçalo do Amaranto, RN) (Da Silva et al, 2000; Borja-Cabrera et al, 2002). Esse antígeno foi também eficaz na imunoterapia contra a LV canina em cães assintomáticos e capaz de bloquear a transmissão da doença entre os cães em uma área epidêmica de LV no Brasil (Nogueira et al, 2005; Santos et al, 2007). Mais recentemente foi demonstrado que o FML constitui um antígeno seguro para a vacinação dos cães e foi também mostrado o seu potencial para a proteção contra a LV canina em duas regiões de grande incidência da doença no Brasil (Parra et al, 2007; Borja-Cabrera et al, 2008). Antígenos secretados de sobrenadantes de culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum*, LiESAp, foram utilizados para a vacinação de cães com muramil dipeptídeo (MDP) como adjuvante, resultando em proteção de 100% contra a infecção experimental e em proteção duradoura contra a LV canina em áreas endêmicas da França (Lemesre et al, 2005; Lemesre et al, 2007). Antígenos recombinantes também têm sido testados quanto ao seu potencial protetor na LV canina, entre os quais pode-se citar: a proteína quimérica Q, obtida pela

expressão em sistema bacteriano de três fragmentos dos genes de proteínas ribossomais e um da histona H2A em fusão, foi utilizada para a vacinação de cães, tendo-se obtido 90% de proteção contra a infecção experimental com a *L. (L.) infantum* (Molano et al, 2003). A mistura de três proteínas recombinantes (TSA, LeIF e LmSTI1), denominada MML, foi imunogênica em cães desafiados com a *L. (L.) chagasi*, não tendo sido avaliado o seu efeito protetor nos animais vacinados (Fujiwara et al, 2005). A vacinação com a MML de cães expostos à infecção natural em uma área endêmica na Itália não foi capaz de proteger os animais (Gradoni et al, 2005). Mais recentemente o antígeno A2 recombinante de *L. (L.) donovani* foi utilizado para a vacinação de cães, tendo induzido respostas do tipo Th1 nos animais vacinados e proteção parcial contra o desafio com a *L. (L.) chagasi* (Fernandes et al, 2008). Esses antígenos têm sido utilizados em formulações com diferentes adjuvantes, sendo os mais frequentes: saponina, associada ao FML de *L. (L.) donovani* (Leishmune[®]) (Silva et al, 2001; Borja-Cabrera et al, 2002; Nogueira et al, 2005) e à proteína recombinante A2 de *L. (L.) donovani* (Fernandes et al, 2008); muramil dipeptídeo (MDP) utilizado com o antígeno LiESAp de *L. (L.) infantum* (Lemesre et al, 2005; Lemesre et al, 2007); BCG associado ao FML de *L. (L.) donovani* (Santos et al, 2002) e à proteína quimérica Q (Molano et al, 2003); emulsões estáveis como MPL-SE e Adjuprime utilizadas com a MML (Fujiwara et al, 2005; Gradoni et al, 2005).

A vacinação gênica tem sido testada em cães contra a leishmaniose visceral induzida experimentalmente, resultando em graus variáveis de proteção. A vacinação com o DNA codificador do antígeno LACK de *L. (L.) infantum*, seguida de um reforço com o vírus vaccinia contendo o gene LACK, conferiu proteção contra o desafio experimental homólogo em 3 dos 5 cães vacinados (Ramiro et al, 2003). O DNA codificador da nucleosídeo hidrolase de *L. (L.) donovani*, o principal antígeno do complexo glicoprotéico FML, foi utilizado para a imunização de cães, tendo protegido 4 dos 6 cães vacinados contra o desafio com a *L. (L.) chagasi* (Borja-Cabrera et al, 2008). A utilização de uma vacina multiantigênica em que foi utilizado o DNA codificador de 4 antígenos de *L. (L.) infantum*, KMP11, TRYP, LACK e gp63, não resultou em proteção dos cães imunizados contra o desafio experimental homólogo (Rodríguez-Cortés et al, 2007).

Recentemente, os estudos dos antígenos presentes em glândulas salivares de *Lu. longipalpis* têm mostrado que eles constituem potenciais candidatos à vacina contra a infecção por *Leishmania* (Morris et al, 2001; Valenzuela et al, 2001). A imunização de hamsters com o DNA codificador de proteínas salivares de *Lu. longipalpis* resultou na identificação de uma proteína de 11 kDa que induziu a produção de IFN- γ e TGF- β e a proteção dos animais contra a infecção por *L. (L.) chagasi* (Brodskyn et al, 2005). Em cães foi analisada a imunogenicidade do extrato de glândula salivar de *Lu. Longipalpis* administrado com o extrato de *L.(V.) braziliensis* e saponina, tendo sido demonstrada a alta frequência e proliferação de linfócitos CD8⁺ específicos para a *L. (L.) chagasi* e a produção de óxido nítrico nos animais imunizados (Giunchetti et al, 2008).

6. Cisteína proteinases de *Leishmania*

Nos últimos anos o estudo de enzimas proteolíticas de parasitas vem aumentando consideravelmente pelo fato de essas moléculas constituírem importantes fatores de virulência diretamente relacionados com a interação parasita-hospedeiro, representando alvos promissores para a imuno e quimioterapia (McKerrow, 1989; Selzer et al, 1999, Das et al, 2001; Sajid e McKerrow, 2002). Entre os protozoários, as principais enzimas proteolíticas caracterizadas pertencem ao grupo das cisteína proteinases, sendo a maioria delas membros da superfamília da papaína. Essa superfamília, por sua vez, é subdividida em duas famílias, a das proteases do tipo catepsina e as do tipo calpaína. As proteases do tipo catepsina são ainda sub-divididas nas sub-famílias das catepsinas dos tipos B e L. Essas guardam grandes semelhanças entre si e apresentam alguns motivos na sequência de aminoácidos que as diferenciam. Ambas são sintetizadas como zimogênios inativos que são posteriormente processados pela remoção da pré e da pró-região para que se tornem enzimas ativas (Eakin et al, 1992).

Em *Leishmania* há predominância de cisteína proteinases do tipo catepsina L que são expressas em grande quantidade nas formas amastigotas e estão localizadas preferencialmente em lisossomos diferenciados denominados megassomos, descritos primeiramente em espécies do complexo *L. (L.) mexicana* (Pupkins et al, 1986) e mais recentemente em *L. (L.) chagasi* (Alberio et al, 2004).

Vários genes codificadores de cisteína proteinases têm sido descritos em espécies cutâneas de *Leishmania* (Duboise et al, 1994; Mottram et al, 1997; Sakanari et al, 1997). Nas espécies visceralizantes, dois genes de cisteína proteinase do tipo catepsina L, *Ldccys1* e *Ldccys2*, foram caracterizados em *L. (L.) chagasi*. Demonstrou-se que esses genes diferem quanto à sequência de aminoácidos e à organização, estando o *Ldccys2* presente em cópia única, enquanto que o *Ldccys1* está representado em 5 cópias organizadas em "tandem" (*Ldccys1A-E*). Sequências correspondentes a esses genes também foram identificadas em *L. (L.) infantum* (*cpa* e *cpb*) e *L. (L.) donovani* (*Lddcys1* e *Lddcys2*), sendo que nessa última o gene *Lddcys1* está presente em 6 cópias (Omara-Opyene e Gedamu, 1997; Mundodi et al, 2002).

Várias evidências mostram a participação das cisteína proteinases de *Leishmania* na virulência do parasita. A análise de enzimas proteolíticas em cepas avirulentas e virulentas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* mostrou que as cisteína proteinases são preferencialmente expressas nas cepas virulentas (Soares et al, 2003). A inibição da expressão do gene *Ldccys2* por nocaute e inibição pelo mRNA antisenso fortemente indicou o envolvimento da cisteína proteinase *Ldccys2* na infecção e sobrevivência da *L. (L.) chagasi* em macrófagos (Mundodi et al, 2002). Camundongos suscetíveis infectados com *L. (L.) mexicana* nocauteada para o gene da cisteína proteinase *cpb* apresentaram lesões consideravelmente menores comparadas às dos animais infectados com parasitas selvagens. Além disso, parasitas nulos para ambos os genes, *cpa* e *cpb*, foram incapazes de desenvolver lesões nesses animais. Interessantemente, a análise das citocinas mostrou que houve mudança de uma resposta predominantemente Th2 para Th1, com produção de IFN- γ e IL-2 nesses animais (Alexander et al, 1998). A análise funcional das catepsinas do tipo B de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* mostrou que elas são capazes de clivar a forma latente do TGF- β 1, convertendo-o à forma ativa inibidora de macrófago (Somanna et al, 2002). Esses resultados indicam que essas enzimas não só agem como fatores de virulência, mas também como moduladoras da resposta imune do hospedeiro.

As cisteína proteinases têm representado também um grande alvo para o diagnóstico das leishmanioses visceral e cutânea e o estudo de vacinas. As cisteína proteinases recombinantes CPA e CPB de *L. (L.) infantum* foram utilizadas no Irã para o diagnóstico por ELISA da leishmaniose visceral humana,

apresentando uma sensibilidade de 11% e 76%, respectivamente, e canina, apresentando sensibilidade de 100% e 76%, respectivamente (Rafati et al, 2003). Em relação à antigenicidade para respostas imunes celulares, foi demonstrada a capacidade de as cisteína proteinases induzirem resposta do tipo Th1 após a morte dos amastigotas de *L. (L.) mexicana* no interior de macrófagos peritoneais de camundongos e a apresentação de epítopos dos parasitas na sua superfície (Wolfram et al, 1995). Duas cisteína proteinases de *L. (L.) major*, CPa e CPb, induziram alta produção de IFN- γ e IL-2 e baixa produção de IL-10 em linfócitos periféricos de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. (V.) guyanensis* (Pascalis et al, 2003). A análise da resposta mostrou que esses animais desenvolveram resposta imune do tipo Th1 com presença de IFN- γ . Foi demonstrado também que camundongos BALB/c imunizados com a cisteína proteinase de 24 kDa purificada a partir de amastigotas de *L. (L.) major* desenvolveram resistência à infecção homóloga. Esses camundongos produziram altos níveis de IFN- γ , gerando uma resposta imune Th1 com consequente resolução da doença (Rafati et al, 2000). Camundongos BALB/c imunizados com uma mistura de genes *cpa* e *cpb* de *L. (L.) major* e com uma mistura de cisteína proteinases recombinantes (rCPb e rCPa) desenvolveram proteção duradoura contra a infecção homóloga (Rafati et al, 2001). Mais recentemente a imunização de camundongos BALB/c com a mistura dos genes *cpa* e *cpb* codificadores de cisteína proteinases de *L. (L.) infantum*, seguida por um reforço com as proteínas rCPA e rCPB juntamente com CpG ODN e Montanide como adjuvantes, resultou em proteção contra a LV nos animais imunizados mediada por linfócitos Th1 (Rafati et al, 2006). Em cães a vacinação com os genes *cpa* e *cpb* de *L. (L.) infantum*, seguida pelo reforço com as cisteína proteinases recombinantes rCPA e rCPB, apresentou grau significativo de proteção nos cães imunizados (Rafati et al, 2005).

O Laboratório de Imunobiologia de *Leishmania* da Disciplina de Parasitologia da EPM/UNIFESP tem desenvolvido estudos sobre antígenos de formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* e sua capacidade de desencadear respostas imunes protetoras na leishmaniose experimental. Entre vários desses antígenos implicados em respostas linfoproliferativas, verificou-se que uma cisteína proteinase de 30 kDa (p30) de formas amastigotas de

Leishmania (L.) chagasi induz a proliferação de linfócitos CD4⁺ Th1 e proteção parcial contra a infecção homóloga em camundongos BALB/c (Pinto et al, 2000). A clonagem do gene p30 e a expressão em vetor bacteriano resultaram em uma proteína recombinante de 47 kDa, rLdccys1. A utilização dessa proteína em testes sorológicos de pacientes com LV mostrou que ela representa um antígeno muito útil ao diagnóstico da LV humana em ensaios de ELISA (Dias et al, 2005). Além disso, demonstrou-se que a rLdccys1 induz respostas proliferativas distintas em linfócitos periféricos humanos e de cães com as várias formas clínicas de LV, havendo predomínio de respostas Th1 em pacientes e cães assintomáticos, Th2 nos sintomáticos e um padrão misto Th1 e Th2 nos oligossintomáticos (Pinheiro et al, 2005).

A continuidade desses estudos envolveu a avaliação da antigenicidade da rLdccys1 para a resposta humoral por ensaios de ELISA em cães com LV provenientes de Teresina, Piauí, assim como para as respostas de DTH nesses animais. Também foram avaliadas as respostas imunes celulares induzidas pela rLdccys1 em cães e a capacidade protetora desse antígeno contra a infecção pela *L. (L.) chagasi*.

OBJETIVOS

O potencial imunogênico de uma cisteína proteinase recombinante de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (rLdccys1) foi avaliado e os objetivos do presente trabalho são assim definidos:

- 1) Avaliação da reatividade da cisteína proteinase recombinante (rLdccys1) de *L. (L.) chagasi* com soros de cães com LV por testes de ELISA.
- 2) Utilização da rLdccys1 em reações de DTH em cães naturalmente infectados com diferentes formas clínicas da LV.
- 3) Imunização com a rLdccys1 de cães não infectados em condições de confinamento e avaliação da produção de linfocinas em culturas de linfócitos periféricos desses animais reestimulados com antígenos de *L. (L.) chagasi*.
- 4) Imunização de cães com a rLdccys1 e desafio desses animais segundo dois esquemas:
 - a) injeção intraperitoneal de amastigotas de *L. (L.) chagasi* isolados de baço de cães infectados;
 - b) picada de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas com promastigotas de *L. (L.) chagasi*.
- 5) Avaliação das respostas imunes e do grau de proteção nos cães imunizados com a rLdccys1.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Descrição da área de estudo

Teresina, capital do Piauí, localiza-se a 360 km do litoral do estado, está a 72 m acima do nível do mar e situa-se a 05°05' de latitude Sul e 42°48' de longitude Oeste (Figura 1). Fundada na confluência dos rios Parnaíba e Poti, possui um clima tropical úmido com uma média de temperatura anual de 27°C (oscilando entre 22 e 39°C) e um total anual de chuvas de 1.300 mm, com umidade relativa média de 68%. O período chuvoso ocorre de janeiro a abril e o de maior temperatura de agosto a dezembro. Sua vegetação predominante é a arbustiva (IBGE, 2002).

Por suas características morfoclimáticas, a cidade reúne as condições ideais para a proliferação de insetos entre eles *Lutzomyia longipalpis* (vetor da leishmaniose visceral). Assim, Teresina apresenta a incidência de 6,33% dos casos de leishmaniose visceral humana registrados no ano de 2008, sendo considerada uma importante área endêmica da doença no país (SINAN/Ministério da Saúde, 2008).

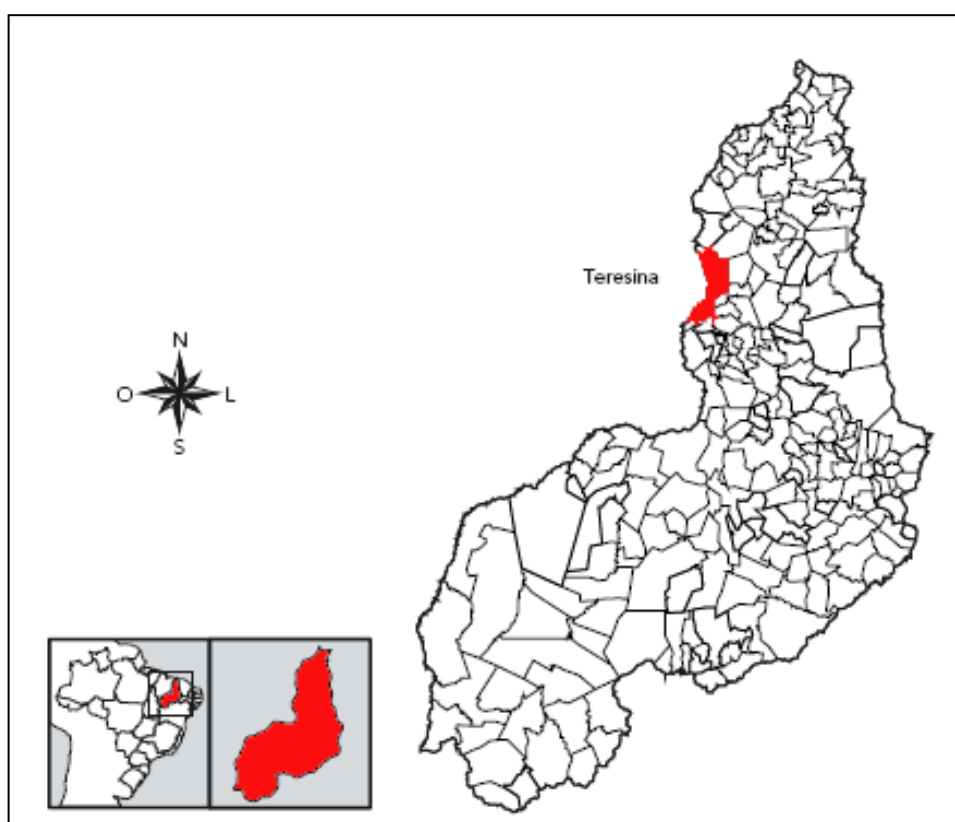


Figura 2: Área de estudo – Teresina, Piauí, Brasil (Fonte: IBGE, 2002)

2. Animais

Os cães utilizados nos experimentos de diagnóstico imunológico e imunização ativa foram de diferentes raças e provenientes da área endêmica descrita no item anterior. A captura dos animais foi realizada por técnicos do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura Municipal de Teresina e a triagem pelo Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Piauí (LASAN-UFPI).

Para os ensaios de diagnóstico imunoenzimático foram utilizados soros de 245 cães (*Canis familiaris*), machos e fêmeas de diferentes raças e idades, capturados em Teresina. Desse total, 209 eram positivos para a leishmaniose visceral, sendo 103 assintomáticos e 106 sintomáticos, 16 positivos para erliquiose e 20 cães tinham babesiose. Foram também incluídos nesse estudo 10 soros de cães experimentalmente infectados com *Trypanosoma cruzi* provenientes de Campo Grande (MS) e 22 soros de cães normais obtidos em São Paulo (SP).

O diagnóstico parasitológico dos cães para a leishmaniose visceral foi feito por identificação dos amastigotas de *L. (L.) chagasi* em “imprintings” de aspirados de medula e linfonodos, mielocultura em NNN suplementado com meio Schneider e xenodiagnóstico, todos realizados no LASAN-UFPI.

Os critérios clínicos para a classificação dos cães sintomáticos foram: febre, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia e alopecia. Esses sinais e sintomas estavam ausentes nos cães assintomáticos.

Para os ensaios de diagnóstico por DTH foram utilizados 261 cães capturados em Teresina pelo CCZ e doados às disciplinas de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade NOVAFAP. Desse total 182 tinham diagnóstico positivo para leishmaniose visceral (LV) canina, sendo 93 assintomáticos e 89 sintomáticos. Os 79 cães restantes eram negativos para LV.

Nos experimentos de imunização ativa foram utilizados 24 cães com diagnóstico negativo para LV. Os animais para esses experimentos foram provenientes de matrizes normais triadas pelo LASAN-UFPI e os exames realizados nesses animais foram mielograma, mielocultura e xenodiagnóstico. Os filhotes foram confinados em canil com tela extrafina por 90 dias do início das imunizações.

3. Cultivo de promastigotas e obtenção de formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

A cepa MHOM/BR/1972/LD de *L. (L.) chagasi* utilizada foi caracterizada e gentilmente cedida pelo Dr. J. J. Shaw, Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil.

Os promastigotas de *L. (L.) chagasi* utilizados para a obtenção dos extratos para os ensaios de ELISA foram mantidos em meio 199 (Gibco) contendo bicarbonato de sódio 4,2 mM, HEPES 40 mM, adenina 1,0 mM, hemina 5 µg/ml, soro fetal bovino (SFB) 10% e urina humana masculina 2% e incubados a 25°C, utilizando-se repiques a cada 5 dias.

Os amastigotas utilizados para a obtenção dos extratos para os ensaios de ELISA foram isolados de hamsters previamente infectados com 1×10^8 parasitas por injeção intraperitoneal. Dois meses após a infecção os animais foram sacrificados e o baço homogeneizado, tratado com saponina 0,2% em PBS (NaCl 0,13 M, NaH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 8 mM, pH 7,2) por 10 min e centrifugado a $1.400 \times g$ por 5 min. O precipitado foi ressuspensão em PBS, centrifugado a $250 \times g$ por 5 min, o sobrenadante novamente centrifugado a $1.400 \times g$ por 5 min e o precipitado resultante ressuspensão em PBS. A suspensão foi mantida sob agitação por 3 h a 26°C, centrifugada a $1.400 \times g$ por 5 min e o precipitado contendo os amastigotas purificados mantido a -20°C até o uso (Barbiéri et al, 1990).

Os amastigotas de *L. (L.) chagasi* utilizados para o desafio dos cães após as imunizações foram obtidos de baço de cães infectados em Teresina e apreendidos pelo CCZ. Após o sacrifício dos cães infectados, de acordo com as normas do CCZ, foi retirado um fragmento do baço, homogeneizado em PBS (NaCl 0,13 M, NaH_2PO_4 2 mM, Na_2HPO_4 8 mM, pH 7,2) e centrifugado a $1.400 \times g$ por 5 min. O precipitado foi ressuspensão em PBS, centrifugado a $250 \times g$ por 5 min, o sobrenadante novamente centrifugado a $1.400 \times g$ por 5 min e o precipitado resultante ressuspensão em PBS. Após a homogeneização, foi feita a contagem dos amastigotas em câmara de Neubauer.

4. Expressão e purificação da cisteína proteinase recombinante de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (rLdccys1)

O produto de PCR correspondente à fase de leitura aberta (ORF) do gene *Ldccys1* previamente obtido em nosso laboratório (Dias, 2004; Dias et al, 2005) e o plasmídio pHis paralelo 3 foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI para a clonagem dirigida. O plasmídio recombinante *Ldccys1*/pHis foi utilizado para transformar *Escherichia coli* BL21DE3. Para a expressão da proteína recombinante a 500 ml de meio LB líquido (bactotripton 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%) contendo ampicilina 100 µg/ml foram acrescentados 25 ml da cultura de bactérias transformadas com o plasmídio recombinante crescidas durante a noite a 37°C. A suspensão foi mantida sob agitação a 37°C até a OD_{600nm}=0,6 e a expressão da proteína foi induzida com IPTG 0,2 mM por mais de 3 h. Após a incubação as bactérias foram centrifugadas a 4.000 x g por 10 min e ressuspensas em 20 ml de tampão de sonicação (NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, PMSF 2 mM) contendo 0,75 mg/ml de lisozima. A amostra foi mantida sob agitação por 30 min no gelo, sonicada em 3 ciclos de 30 seg e centrifugada a 12.000 x g por 30 min. O precipitado foi ressuspenso e lavado 3 vezes com 20 ml de CHAPS 1% em Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e solubilizado em 20 ml de tampão de solubilização (NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, uréia 8 M).

Para a purificação da proteína recombinante, 2 ml da resina contendo níquel (Ni-NTA Superflow agarose matrix-QIAGEN) foram acrescentados à suspensão de bactérias solubilizada como descrito e esta foi mantida sob agitação por 2 h. A mistura foi transferida para tubos Falcon de 15 ml e a resina lavada três vezes com 3 ml de tampão de ligação (Imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e uréia 6 M). A seguir a resina foi lavada três vezes na solução contendo imidazol, 20 mM, NaCl 500 mM, Tris 20 mM pH 8,0 e uréia 6 M. A proteína recombinante ligada à resina foi eluída com 20 ml do tampão de eluição (Imidazol 1 M, NaCl 500 mM, Tris 20 mM pH 8,0 e uréia 6 M) e coletada em frações de 2 ml. As frações foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% e aquelas que continham a proteína recombinante, visualizada no gel com massa molecular aparente de 47 kDa, foram misturadas e dialisadas por 48 h a 4°C contra Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 (Skeiky et al, 2002).

5. Testes de ELISA

As reações de ELISA foram realizadas em placas de 96 poços (high binding Costar) após a sensibilização com 200 ng/poço da rLdccys1 e 100 ng/poço dos extratos de amastigotas e promastigotas de *L. (L.) chagasi* preparados em tampão $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,05 M, pH 9,6, incubação durante a noite a 4°C e bloqueio com PBS-Molico 5% por 1 h à temperatura ambiente. Os soros dos cães foram previamente testados em diluições seriadas de 1:200 a 1:12.800 em PBS-Molico 5% e posteriormente à diluição de 1:500. As placas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente, lavadas com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e incubadas com anticorpo anti-IgG de cão conjugado com peroxidase (Bio-Rad) diluído 1:500 por 1 h à temperatura ambiente. Após várias lavagens a reação foi revelada adicionando-se 100 µl/poço de tampão de revelação (Na_2HPO_4 0,05 M, ácido cítrico 0,05 M, pH 4,5) contendo ortofenilenodiamina (OPD) 0,5 mg/ml e H_2O_2 0,03% por 15 min, interrompendo-se a reação com 50 µl/poço de H_2SO_4 4 N. A absorbância foi medida a 492 nm em microleitor de ELISA Labsystem Multiskan MS.

6. Ensaio de hipersensibilidade tardia (DTH)

As reações de DTH com a proteína recombinante foram realizadas pela injeção por via subcutânea de 10 µg da rLdccys1 na face interna da coxa direita de cães normais e infectados ou 20 µg do extrato dos amastigotas de *L. (L.) chagasi*. A escolha dessa região para a inoculação da proteína recombinante é devida à textura mais fina da pele e ausência de pelos nesse local que facilita a leitura dos resultados. O controle negativo foi feito injetando-se PBS estéril na face interna da coxa esquerda de cada animal.

A avaliação dos resultados foi feita 24, 48 e 72 h após o inóculo dos antígenos pela medida do maior diâmetro da área do nódulo formado com o uso de paquímetro. No cálculo dos resultados foram desprezadas as áreas hiperemiadas que não apresentavam endurecimento.

A análise histológica dos nódulos obtidos em resposta à inoculação dos diferentes antígenos foi também realizada. As biópsias dos nódulos foram obtidas

após 48 h com os animais anestesiados. Os tecidos removidos foram fixados por 24 h em formaldeído 10% e desidratados em álcool em concentrações crescentes de 50%, 75% e 100% (1 h em cada concentração). Em seguida os tecidos foram diafanizados por 1 h em solução de xilol e álcool (1:1). Após esse procedimento as amostras foram impregnadas em parafina fundida e incluídas em blocos de parafina. Os tecidos incluídos em parafina foram cortados em micrótomo manual com espessura de 5 µm. Os cortes foram montados em lâmina de vidro e submetidos à técnica de coloração clássica da hematoxilina-eosina.

7. Imunização dos animais com a rLdccys1

A imunização de cães com a rLdccys1 foi realizada em 4 grupos de animais confinados em canil protegido por tela extrafina. Os animais utilizados nos experimentos de imunização tinham 90 dias e foram procedentes de matrizes não infectadas de várias raças e confinadas antes do parto. O adjuvante utilizado foi *Propionibacterium acnes* que foi crescida em meio de cultura para anaerobiose Hemobac em estufa a 37°C por 3 dias. Após esse período de crescimento, as bactérias foram centrifugadas por 30 minutos a 2.000 g e ressuspensas em solução fisiológica 0,9% obtida comercialmente, repetindo-se a lavagem duas vezes. A suspensão foi então autoclavada e armazenada a 4°C até o momento do uso, determinando-se a concentração protéica pelo método de Bradford, 1976.

O primeiro grupo (n=3) recebeu 3 doses subcutâneas de 1 ml de PBS. O segundo grupo (n=4) recebeu 3 doses subcutâneas de *P. acnes* (250 µg do lisado da bactéria autoclavada). O terceiro grupo (n=8) recebeu 3 doses de 150 µg cada uma de rLdccys1. O quarto grupo (n=12) recebeu 3 doses subcutâneas de 150 µg cada uma de rLdccys1 misturada a 250 µg de *P. acnes*. Todas as doses foram administradas com intervalo de 15 dias entre cada uma delas. Duas semanas após a última dose foram coletados os linfócitos do sangue periférico para os ensaios de linfoproliferação e a dosagem de citocinas.

8. Obtenção dos linfócitos do sangue periférico dos cães imunizados com a rLdccys1

As células mononucleares para os ensaios de linfoproliferação e a dosagem das citocinas foram obtidas dos cães previamente imunizados como descrito no item anterior. O sangue periférico dos animais foi coletado em tubos heparinizados mantidos em isopor com gelo e enviados à Disciplina de Parasitologia da EPM/UNIFESP. Cerca de 12 horas após a coleta as células mononucleares foram separadas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences).

A separação foi feita utilizando-se 4 ml do sangue heparinado diluído 1:2 em PBS colocados lentamente sobre 3 ml da solução de Ficoll-Hypaque. Os tubos foram centrifugados a $400 \times g$ por 30 min a 18°C . O anel de células mononucleares formado na interface entre o plasma e o Ficoll-Hypaque foi recolhido com pipeta Pasteur e transferido para tubos Falcon de 15 ml. As células foram lavadas 3 vezes ($400 \times g/5 \text{ min}/18^{\circ}\text{C}$) com PBS e ao final ressuspensas em 1 ml de meio RPMI 1640 contendo NaHCO_3 20 mM, HEPES 10 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$, L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 50 μM , piruvato de sódio 5 mM, mistura de aminoácidos não essenciais 100 μM (Sigma) e soro canino normal 10% (meio completo). Em seguida as células foram contadas em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para $1 \times 10^7/\text{ml}$ em meio completo. A viabilidade das células foi avaliada utilizando-se o corante azul de Tripan (Sigma).

9. Ensaio de linfoproliferação

Os experimentos de proliferação linfoblástica foram feitos utilizando-se os linfócitos isolados do sangue periférico dos cães imunizados. Foram utilizados 3×10^5 linfócitos por cavidade em placas de 96 poços (Costar) em volume final de 200 μl em meio completo. Os linfócitos foram cultivados em triplicatas na ausência de antígeno, na presença do extrato protéico de amastigotas de *L. (L.) chagasi* (correspondente a 1×10^7 amastigotas) ou da rLdccys1 2,5 $\mu\text{g/ml}$. As culturas de linfócitos foram mantidas a 37°C em estufa incubadora umidificada contendo 5% de CO_2 por 96 horas. Doze a dezoito horas antes da coleta das células em papel

de fibra de vidro foi adicionado 1 μ Ci de ^3H -TdR (metil- ^3H -timidina, 86 Ci/mmol, Amershan Bioscience) em cada cavidade. A radioatividade incorporada foi medida em β -cintilador (1600 TR, TRI Carb; Packard, Meriden, Conn.) utilizando líquido de cintilação (PPO 4 g/l, POPOP 0,4 mg/l em tolueno 100%). Os resultados foram expressos como a média das contagens por minuto (cpm) de poços em triplicata $\pm$ desvio padrão ou na forma de índice de estimulação (IE) calculado pela média das triplicatas em cpm na presença de antígeno dividida pela média das triplicatas em cpm das células não estimuladas. Os índices de estimulação iguais ou superiores a 2 ($\text{IE} \geq 2$) foram considerados significantes.

10. Dosagem de citocinas nos sobrenadantes das culturas de linfócitos

As culturas para as dosagens de citocinas foram feitas utilizando-se $1,0 \times 10^7$ linfócitos por cavidade em placas de 24 poços (Costar) em volume final de 1 ml do meio completo. Os linfócitos foram cultivados na ausência de antígeno, na presença de extrato protéico de amastigotas de *L. (L.) chagasi* (PAM) correspondente a 1×10^7 amastigotas/cavidade e rLdccys1 à concentração de 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Após 96 horas de incubação a 37°C em estufa a 5% de CO_2 , os linfócitos foram recolhidos, colocados em tubos “Eppendorf” e centrifugados a $11.000 \times g$ por 2 min. Os sobrenadantes foram mantidos a -20°C para a dosagem de citocinas.

As dosagens de IFN- γ e IL-10 foram feitas pelo método de ELISA de captura, utilizando-se “kit” da R&D Systems.

11. Imunização ativa dos cães com a rLdccys1 e desafio

Os cães foram imunizados com a rLdccys1 de acordo com o protocolo descrito no item 7 de Materiais e Métodos. Para o desafio dos cães imunizados foram utilizados dois esquemas: a) injeção intraperitoneal de amastigotas de *L. (L.) chagasi* previamente isolados de cães naturalmente infectados; b) picada das fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas com a *L. (L.) chagasi*.

11.1 Desafio dos cães imunizados com a rLdccys1 pela injeção intraperitoneal de amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Nesses experimentos foram utilizados 3 grupos de cães obtidos de matrizes não infectadas e confinadas antes do parto, fornecidas pelo CCZ e examinadas no LASAN-UFPI. Os animais foram mantidos em confinamento em canil protegido por tela extrafina. O grupo controle (n=4) recebeu 3 doses subcutâneas de PBS (1ml/dose). O outro grupo controle (n=4) recebeu 3 doses subcutâneas de *P. acnes* (250 µg por dose). O grupo experimental (n=4) recebeu 3 doses de 150 µg cada uma de rLdccys1 juntamente com 250 µg de *P. acnes*. Todas as doses foram administradas com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados pela injeção intraperitoneal de 1×10^4 amastigotas de *L. (L.) chagasi* recém-isolados do baço de cães, como descrito no item 3, quinze dias após a última imunização.

Foram coletadas amostras de soro de todos os animais antes da imunização, após a administração de cada dose e após o desafio. Os soros foram utilizados para a avaliação de IFN- γ e IL-10 dos cães imunizados e desafiados.

A avaliação do parasitismo dos animais foi feita pela contagem dos amastigotas da *L. (L.) chagasi* em cortes de fígado, baço, linfonodo poplíteo e pele e em esfregaços da medula óssea fixados e corados pela hematoxilina-eosina.

11.2. Desafio dos cães imunizados com a rLdccys1 pela picada de *Lutzomyia longipalpis*

Antes do desafio dos cães imunizados com a rLdccys1 pela picada das fêmeas de *Lu. longipalpis*, dois esquemas de infecção dos flebotomíneos pela *L. (L.) chagasi* foram testados visando obter o melhor índice de infecção desses insetos.

11.2.1. Infecção das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* pelo repasto sanguíneo em cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Os flebotomíneos utilizados nesses experimentos foram provenientes da colônia de *Lu. longipalpis* mantida no Laboratório de Entomologia Veterinária do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí.

Para dar início à colônia os insetos foram capturados na periferia da cidade de Teresina, em locais com características favoráveis à proliferação de flebotomíneos, tais como: presença de vegetação abundante, acúmulo de matéria orgânica em decomposição no solo e abrigos de animais, principalmente galinhas e porcos. As capturas foram feitas com armadilhas entomológicas do tipo CDC, montadas no final da tarde e recolhidas ao amanhecer. Os insetos capturados foram colocados em gaiolas de náilon que foram transportadas ao Laboratório de Entomologia do LASAN-UFPI e mantidas durante 6 dias à temperatura de 25-27°C e umidade relativa de 86% em incubadora BOD (Biosystem). Os flebotomíneos adultos foram coletados com sugador bucal do tipo Castro (Figura 2) e após a identificação macroscópica das fêmeas de *Lu. longipalpis* (ausência das gonapófises na porção posterior dos insetos) elas foram colocadas em potes em de PVC com tela extrafina na parte inferior e mantidas em jejum por 24 horas (Figura 3). Em seguida esses potes foram colocados em contato com a orelha de cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* e anestesiados com tiopental sódico (25 mg/kg peso). Após o repasto de 30 minutos, as fêmeas de *Lu. longipalpis* foram coletadas e colocadas em gaiolas entomológicas contendo solução de mel na proporção de 1:1 em água destilada e permaneceram por 8 dias a 25°C e umidade relativa de 86% em estufa BOD. Após esse período, as fêmeas foram dissecadas em placa de Petri contendo PBS, com estiletes extrafinos para a verificação do índice de infectividade.



Figura 3: Técnica (LASAN-UFPI) coletando fêmeas de *Lu. longipalpis* com sugador tipo Castro.

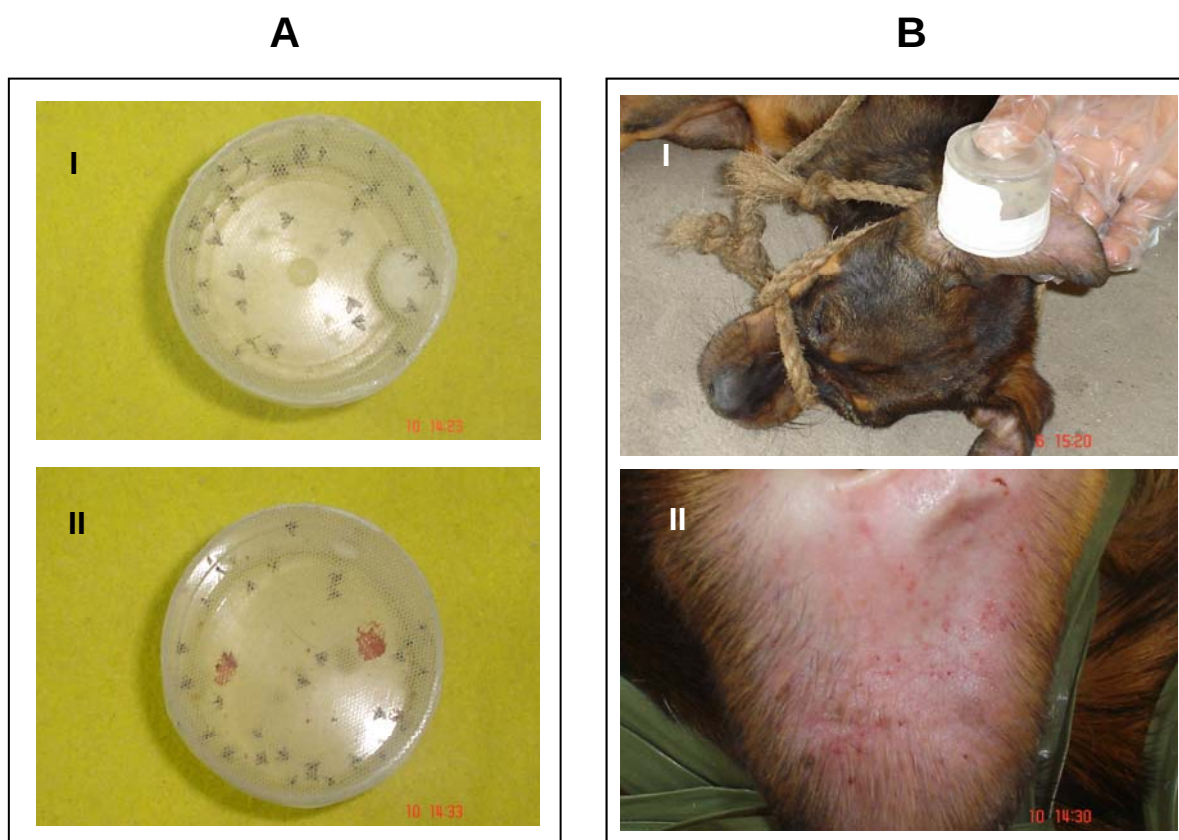


Figura 4: A - Potes de PVC com tela extrafina contendo 25 fêmeas de *Lu. longipalpis* antes do repasto sanguíneo (I) e após o repasto (II); B - Infecção de *Lu. longipalpis* em cão infectado com *L. (L.) chagasi*. I – Fêmeas em contato com o cão anestesiado; II – Aspecto da orelha do cão após o repasto sanguíneo.

11.2.2. Infecção das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* por meio de alimentador artificial

Outro grupo de fêmeas de *Lu. longipalpis* foi infectado em alimentador artificial contendo sangue de cão com promastigotas de *L. (L.) chagasi*. O alimentador artificial foi elaborado de acordo com a metodologia descrita por Michalsky et al (2002). Os promastigotas de *L. (L.) chagasi* (2×10^7) foram obtidos a partir do cultivo dos amastigotas, recém-isolados de cães infectados, em meio axênico durante 3 a 4 dias a 25°C, lavados em PBS, centrifugados a 2.500 rpm por 4 min e ressuspensos em 1ml de sangue de cão heparinizado e introduzido no alimentador artificial revestido na parte inferior por pele de pinto (*Gallus gallus*). O alimentador foi mantido em um recipiente isolado conservado à temperatura de 37°C pela circulação de água de um banho-Maria por 1 hora (Figura 4). Após o repasto no alimentador artificial, os flebotomíneos foram soltos em gaiola de náilon e permaneceram na estufa BOD onde receberam solução de açúcar contendo antibiótico (5ml de glicose, 30ml de água destilada e garamicina 0,001%). Após 8 dias as fêmeas foram dissecadas para a determinação do índice de infectividade. A dissecação foi feita em placa de Petri, adicionando-se uma gota de solução salina para facilitar a separação do trato digestivo com microestiletas para a observação ao microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

Os dados foram comparados para determinar a melhor metodologia de infecção das fêmeas de *Lu. longipalpis*.

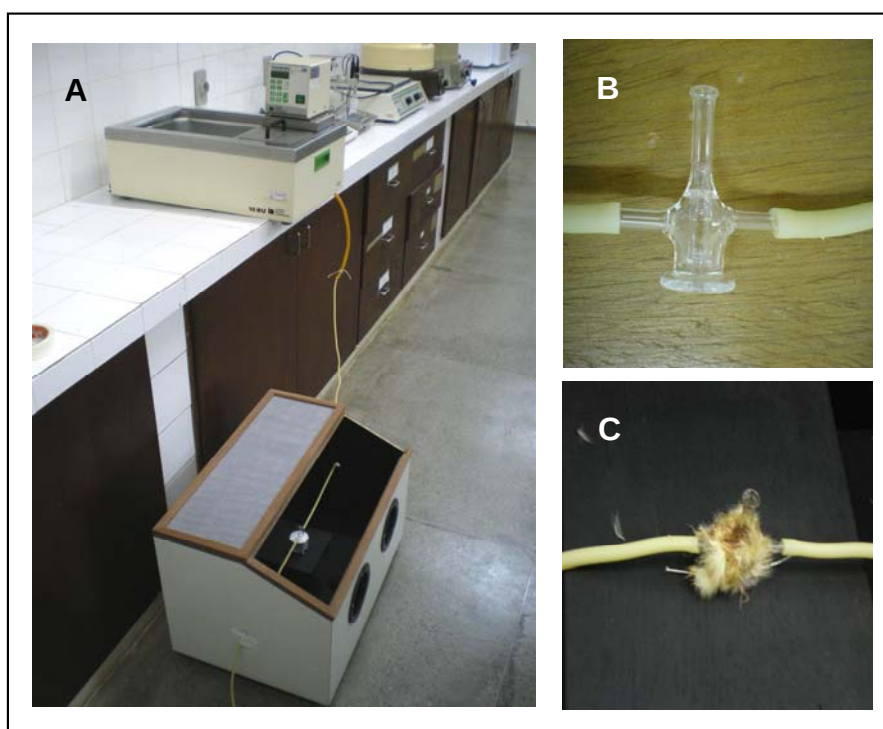


Figura 5: Alimentador artificial para a infecção de *Lu. longipalpis* com promastigotas de *L. (L.) chagasi*. A – Alimentador artificial completo. B - Detalhe mostrando o alimentador conectado a mangueiras de água. C – Alimentador artificial adaptado à membrana de frango.

Após o estabelecimento das melhores condições de infecção dos cães pela picada do *Lu. longipalpis*, foram iniciados os experimentos de imunização dos animais para o desafio segundo esse esquema. Foram utilizados 3 grupos de cães obtidos de matrizes não infectadas e confinadas antes do parto, fornecidas pelo CCZ e examinadas no LASAN-UFPI. Os animais foram mantidos em confinamento em canil protegido por tela extrafina. O grupo controle (n=4) recebeu 3 doses subcutâneas de PBS (1ml/dose). O outro grupo controle (n=4) recebeu 3 doses subcutâneas de *P. acnes* (400 µg por dose). O grupo experimental (n=4) recebeu 3 doses de 150 µg cada uma de rLdcccys1 juntamente com 250 µg de *P. acnes*. Todas as doses foram administradas com intervalo de 15 dias. Os animais foram desafiados pela picada do *Lu. longipalpis* utilizando-se para cada animal dois grupos de 25 fêmeas previamente infectadas no alimentador artificial, como descrito, contendo sangue de cão heparinizado com 2×10^7 promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Os cães foram anestesiados e submetidos

às picadas das fêmeas de flebotomíneos por 30 minutos. Foram coletadas amostras de soro de todos os animais antes da imunização, após a administração de cada dose e após o desafio. Os soros foram utilizados para a avaliação de IFN- γ e IL-10 dos cães imunizados e desafiados.

A avaliação do parasitismo nos cães foi feita pela contagem dos parasitas nos cortes dos vários órgãos e esfregaços da medula óssea, como descrito no item 11.1.

12. Análise estatística

Para avaliar a significância dos resultados foi feita a análise estatística pelos testes ANOVA disponíveis no programa GraphPad Prism versão 5.0. O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi também calculado pelo programa GraphPad Prism versão 5.0.

RESULTADOS

1. Triagem dos cães para os testes de diagnóstico da LV por ELISA e DTH

A triagem dos cães foi realizada no CCZ e no Laboratório de Sanidade Animal da Universidade Federal do Piauí (LASAN-UFPI).

Os seguintes métodos foram utilizados para o diagnóstico da LV canina: mielograma, mielocultura e imunofluorescência indireta (IFI). Após a confirmação da positividade para a LV canina, foram colhidos 2 ml de sangue de cada animal em tubo Eppendorf sem anticoagulante para obtenção do soro. As alíquotas de soro foram utilizadas nos ensaios de ELISA.

Os animais com LV foram submetidos à avaliação clínica e classificados em assintomáticos e sintomáticos. Os parâmetros clínicos utilizados nessa classificação estão representados na tabela abaixo.

Tabela 1: Critérios clínicos para a classificação de cães com LVC em assintomáticos e sintomáticos

Classificação clínica	Sinais/sintomas clínicos*	Isolamento do parasita
Assintomáticos	– – +	Sim
Sintomáticos	+ + +	Sim

* – – +: febre; +++: perda de peso, alopecia, hepatoesplenomegalia e pancitopenia.

2. Avaliação da antigenicidade da rLdccys1 em soros de cães com a LV

Inicialmente a antigenicidade da proteína rLdccys1 para a resposta humoral foi comparada à dos extratos de amastigotas e promastigotas de *L. (L.) chagasi* por ELISA utilizando soros de 10 cães com diagnóstico confirmado de LV. Os soros foram testados em diluições seriadas de 1:200 a 1:12.800 para a determinação dos títulos de anticorpos contra a rLdccys1 e os extratos de amastigotas e promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Após a padronização da concentração dos antígenos a serem utilizados nos ensaios de ELISA, verificou-

se que a concentração ótima a ser utilizada é de 100 ng/poço dos extratos do parasita e 200 ng/poço da rLdccys1. A Figura 6 mostra que os cães com LV apresentam níveis séricos elevados de anticorpos contra a rLdccys1 de *L. (L.) chagasi*, com títulos comparáveis àqueles obtidos com extrato de promastigota até à diluição de 1:1.600.

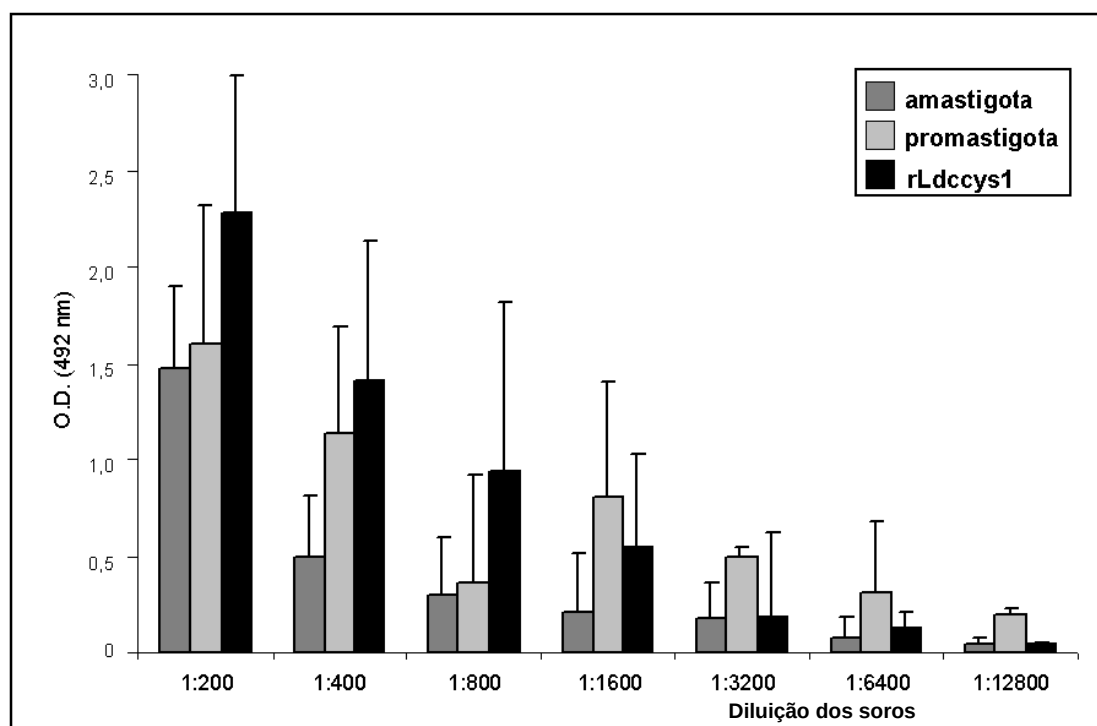


Figura 6: Ensaio por ELISA da reatividade da cisteína proteinase recombinante de *L. (L.) chagasi* (rLdccys1) com soros de cães com LV. As microplacas foram adsorvidas com 200 ng/poço da rLdccys1 ou 100 ng/poço dos extratos de promastigotas e amastigotas da *L. (L.) chagasi*. O conjugado anti-IgG de cão com peroxidase foi utilizado à diluição de 1:500. Os resultados são expressos como a média da densidade óptica (OD) de 10 soros dos cães com LV testados individualmente nas diluições indicadas.

3. Determinação da sensibilidade e especificidade da rLdccys1 por ELISA

A sensibilidade da rLdccys1 de *L. (L.) chagasi* nos ensaios de ELISA para os soros de cães com LV foi determinada e comparada com a apresentada pelos extratos de amastigotas e promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Do total de 209 soros dos cães com LV, 98% reagiram com a rLdccys1, enquanto que 86% e 89% foram reativos com os extratos de promastigotas e amastigotas, respectivamente (Figura 7). Entre os 209 soros, 103 foram isolados de cães assintomáticos e 106 de sintomáticos. A média dos valores de absorbância para os cães assintomáticos foi 0,45, 0,58 e 0,36 para os extratos de amastigotas, promastigotas e a rLdccys1, respectivamente, enquanto que as médias para os animais sintomáticos foram 1,23, 1,05 e 1,55. Esses resultados mostram que os títulos de anticorpos dos cães sintomáticos foram significativamente superiores aos dos animais assintomáticos e as diferenças na resposta humoral entre os dois grupos foram mais evidentes quando a rLdccys1 foi utilizada nesses ensaios (Figura 7).

A especificidade da rLdccys1 foi avaliada pelos testes dos soros dos animais controles e de cães com outras doenças comuns nas regiões endêmicas de LV, tais como erliquiose, babesiose e doença de Chagas (Figura 7). A rLdccys1 foi muito específica (96%) comparada aos extratos de promastigotas e amastigotas (68% e 69%, respectivamente). Ela não apresentou reatividade cruzada com os soros de cães com doença de Chagas. As reações positivas com os soros de cães com babesiose (5%, n=20) e erliquiose (6%, n=16) foram relativamente baixas e somente dois resultados falso positivos foram encontrados com os soros de 22 controles saudáveis. Ao contrário, os extratos de amastigotas e promastigotas apresentaram altas taxas de reatividade cruzada com os soros de cães com babesiose (60% e 65%, respectivamente, n=20) e erliquiose (40% e 69%, respectivamente, n=16), embora ambos não tenham reagido com os soros de cães com doença de Chagas (n=10). A Tabela 2 mostra a sensibilidade, especificidade, os valores preditos positivo e negativo dos três antígenos utilizados nos ensaios de ELISA. Os dados demonstraram que a rLdccys1 foi significativamente mais específica do que os extratos da *L. (L.) chagasi* para o diagnóstico da LV canina por ELISA.

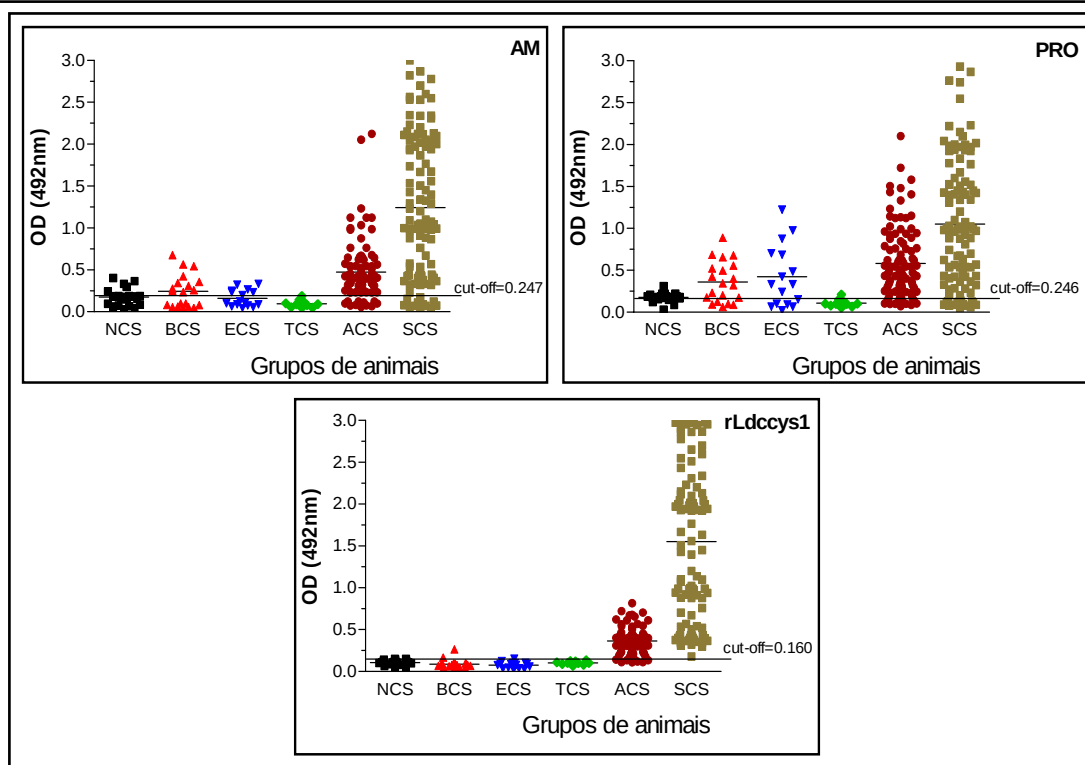


Figura 7: Reatividade dos soros dos cães com LV, outras doenças e controles saudáveis com a rLdccys1 (200 ng/poço) e os extratos dos amastigotas (AM) e promastigotas (PRO) (100 ng/poço). Os ensaios de ELISA foram realizados com os soros de todos os cães diluídos 1:500. A linha horizontal representa os valores de “cut-off” para cada antígeno e foram calculados adicionando dois valores de desvio padrão da densidade óptica à média das densidades ópticas de 22 soros dos cães normais. NCS = soro de cães normais; BCS = soros de cães com babesiose; ECS = soros de cães com erliquiose; TCS = soros de cães com doença de Chagas; ACS = soros de cães assintomáticos; SCS = soros de cães sintomáticos.

Tabela 2: "Performance" do antígeno rLdccys1 e dos extratos de *L. (L.) chagasi* no diagnóstico da LV canina por ELISA

Antígeno	Porcentagem (nº de soros positivos/nº total dos soros)			
	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo positivo	Valor preditivo negativo
Amastigota	89 (186/209 ^a)	69 (47/68 ^b)	87	69
Promastigota	86 (179/209)	68 (46/68)	86	68
rLdccys1	98 (206/209)	96 (65/68)	96	95

^a Número total de soros de cães com LV;

^b Número total de soros de cães normais e com outras doenças.

4. Reatividade da rLdccys1 nas reações de hipersensibilidade tardia (DTH) em cães com leishmaniose visceral (LV)

As respostas de DTH foram avaliadas após a injeção subcutânea de 10 µg da rLdccys1 ou 20 µg do extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi* na face interna da coxa direita dos cães assintomáticos e sintomáticos. O diâmetro do nódulo formado foi medido 24, 48 e 72 horas após a injeção dos antígenos e foi máximo com 48 horas. A padronização da dose da rLdccys1 injetada foi determinada em um ensaio de intradermorreação prévio, utilizando-se 5, 10, 20 e 30 µg. A injeção de 10, 20 e 30 µg da rLdccys1 resultou em um nódulo significativo após 48 h sem manifestação de necrose local (Tabela 3). Os ensaios com o extrato total de amastigotas revelaram que a injeção de 10 e 20 µg resultava em um nódulo palpável após 48 h, sem foco necrótico, enquanto que a de 30 µg levou à forte necrose local, dificultando a medida do nódulo (Tabela 3). Nos ensaios subsequentes de DTH utilizaram-se 10 µg da rLdccys1 e 20 µg do extrato do parasita.

Tabela 3: Padronização da dose da rLdccys1 e do extrato dos amastigotas utilizada nos ensaios de DTH 48 h após a injeção subcutânea desses antígenos.

		Mielograma	Sintomas	Eritema	Necrose	Nódulo
Grupo 1: rLdccys1	Cão 1 (5 µg)	+	–	–	–	–/+
	Cão 2 (10 µg)	+	–	+	–	+
	Cão 3 (20 µg)	+	–	+	–	+
	Cão4 (30 µg)	+	–	+	–	+
Grupo 2: AM	Cão 1 (5 µg)	+	–	–	–	–
	Cão 2 (10 µg)	+	–	+	–	–/+
	Cão 3 (20 µg)	+	–	+	–	+
	Cão 4 (30 µg)	+	–	+	+	+

Foram submetidos ao teste de DTH 41 cães assintomáticos e todos apresentaram resposta positiva à rLdccys1. Nesses animais 48 horas após a injeção do antígeno o diâmetro do nódulo ultrapassou 10 mm. Por outro lado, os cães sintomáticos avaliados (n=56) não apresentaram reatividade significativa ao antígeno recombinante (Figura 8). Resultados semelhantes foram observados nos cães injetados com o extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi*, porém o diâmetro do nódulo dos animais assintomáticos (n=37) foi significativamente menor comparado ao dos animais injetados com a rLdccys1 (Figura 8). Além disso, nos cortes dos nódulos dos cães assintomáticos injetados com o extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi* foi observada a predominância de áreas hemorrágicas e necróticas (Figura 9 – B-2), enquanto que os animais assintomáticos injetados com a rLdccys1 apresentaram reação granulomatosa típica com infiltrado de células mononucleares (Figura 9 – C-2).

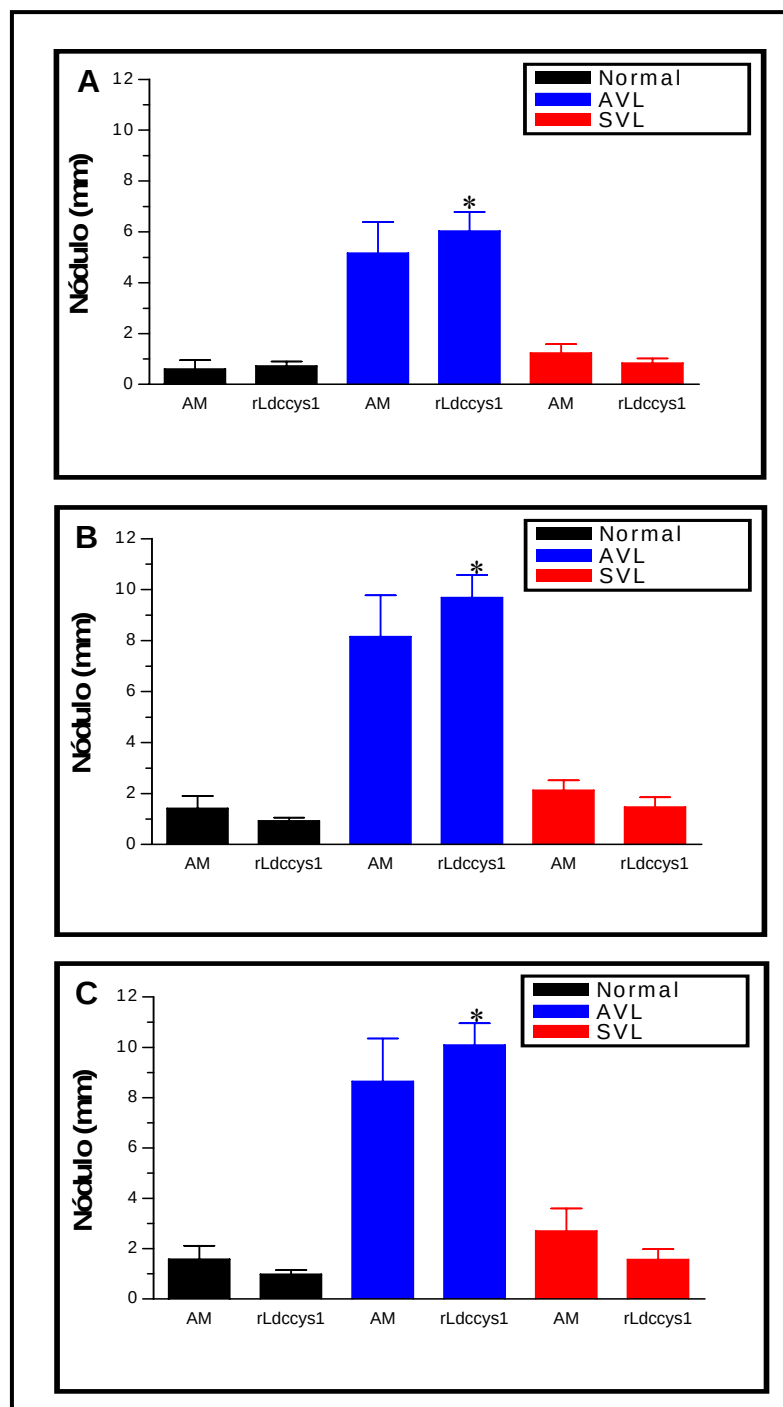


Figura 8: Reação de hipersensibilidade tardia (DTH) induzida pelos antígenos de *L. (L.) chagasi* em cães após 24 (A), 48 (B) e 72 horas (C). Cães não infectados (AM: n=38; rLdccys1: n=41), cães assintomáticos – AVL (AM: n=37; rLdccys1: n=41) e sintomáticos – SVL (AM: n=42; rLdccys1: n=56). O asterisco representa a diferença significativa entre as respostas de DTH induzidas pela rLdccys1 e pelo extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi* (AM) em cães assintomáticos ($P<0,05$).

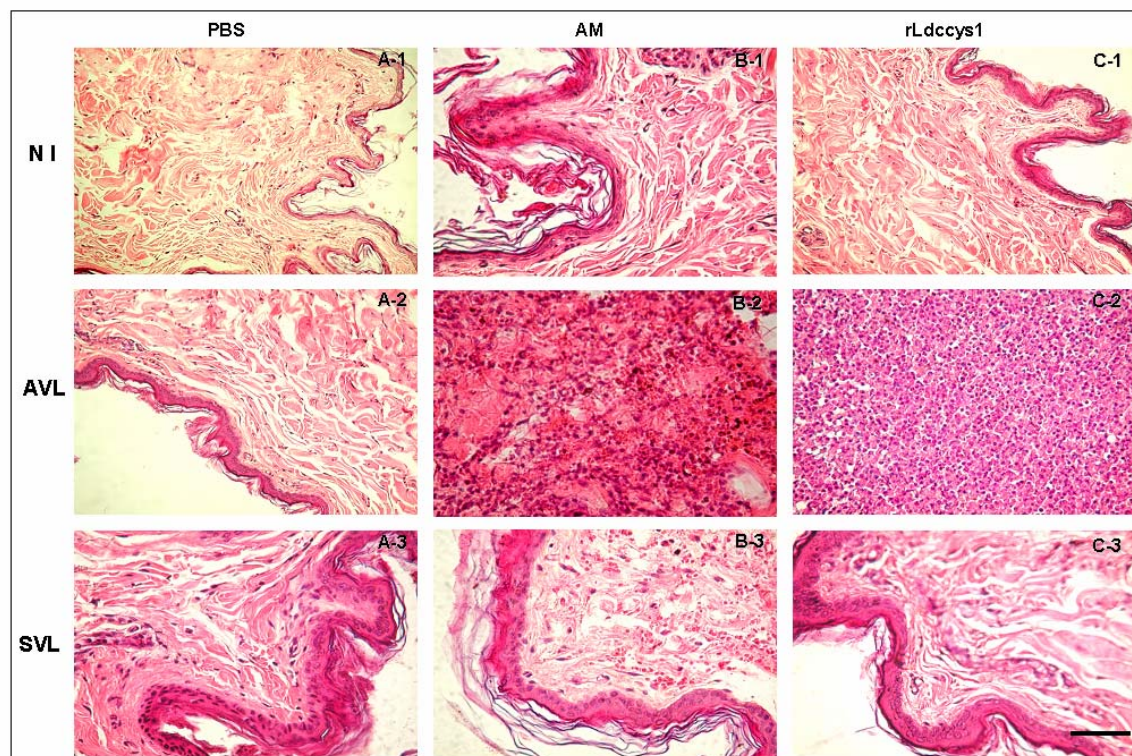


Figura 9: Análise histológica dos nódulos dos cães infectados com a *L. (L.) chagasi* seguindo a injeção subcutânea do extrato de amastigotas (AM) e a cisteína proteinase recombinante rLdccys1. São mostrados os cortes histológicos dos nódulos 48 horas após a injeção dos antígenos entre os controles (cães não infectados), cães assintomáticos e sintomáticos. Coloração pela hematoxilina-eosina. NI – cães não infectados; AVL – cães assintomáticos; SVL – cães sintomáticos. Barra = 150 μ m.

5. Correlação inversa entre os resultados de ELISA e DTH na leishmaniose visceral canina

A análise dos dados obtidos nos ensaios de ELISA e DTH realizados com a rLdcccys1 e os extratos de amastigotas de *L. (L.) chagasi* mostrou a correlação inversa entre as respostas humoral e celular na leishmaniose visceral canina (Figura 10).

Os cães assintomáticos exibiram uma forte resposta de DTH e baixos níveis de imunoglobulinas anti-*L. (L.) chagasi*, enquanto que nos cães sintomáticos a resposta de DTH foi diminuída ou ausente e os títulos de anticorpos bastante elevados (Figura 10 A). Essa correlação inversa foi mais evidente quando a rLdcccys1 foi utilizada como antígeno, obtendo-se índice de correlação de $-0,97$ e $-0,93$ para os cães assintomáticos e sintomáticos, respectivamente (Figura 10 B).

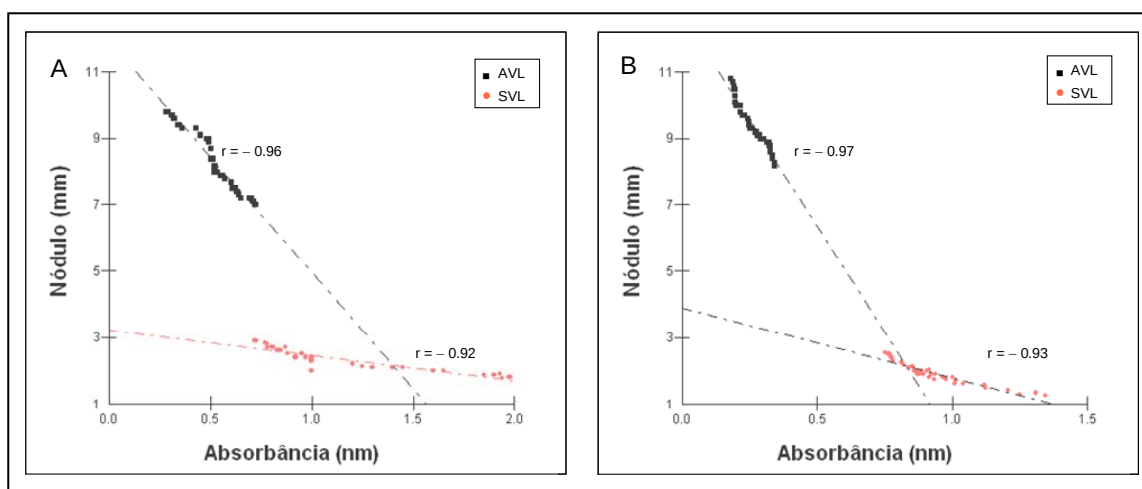


Figura 10: Correlação inversa entre os dados de ELISA e DTH em cães com leishmaniose visceral assintomáticos (AVL) e sintomáticos (SVL) com o extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi* (A) ou a rLdcccys1 (B).

6. Avaliação das respostas imunes desencadeadas em cães imunizados com a rLdccys1

Os experimentos de imunização nos cães confinados foram realizados com quatro grupos de animais que receberam PBS (n=3), *P. acnes* (n=4), rLdccys1(n=8) e *P. acnes* + rLdccys1 (n=12). Os animais foram imunizados com três doses de 150 µg da rLdccys1, com intervalo de 15 dias entre elas e 15 dias após a última dose isolaram-se os linfócitos do sangue periférico para os ensaios de linfoproliferação e análise do perfil de citocinas. Nesses ensaios utilizou-se a rLdccys1 ou o extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi* para o reestímulo *in vitro* dos linfócitos, como descrito em Materiais e Métodos (item 9). Após quatro dias de cultura, foi avaliado o índice de estimulação (I.E.) e os níveis de IFN- γ e IL-10 no sobrenadante dessas culturas (Figura 11).

Esses resultados revelaram que respostas linfoproliferativas significantes foram induzidas pela rLdccys1 apenas nos animais previamente imunizados com esse antígeno associado a *P. acnes* como adjuvante (I.E. médio de 10). O índice de estimulação obtido nas culturas de linfócitos dos animais imunizados apenas com a rLdccys1 ou a *P. acnes* ficou em torno de 2,5 (Figura 11A). A proliferação linfoblástica na presença do extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi* também foi elevada, porém esse estímulo foi significativamente mais baixo do que o induzido pela rLdccys1 com I.E. médio de 7,8 (Figura 11A).

A análise do perfil de citocinas nos sobrenadantes das culturas de linfócitos periféricos desses animais revelou uma grande produção de IFN- γ nas culturas de células mononucleares dos cães imunizados com a rLdccys1 + *P. acnes*. No sobrenadante dessas culturas a concentração de IFN- γ foi aproximadamente quatro vezes maior que a das culturas de linfócitos dos demais grupos (3,9 ng/ml) (Figura 11B). Os níveis de IL-10 no sobrenadante das culturas de linfócitos periféricos dos quatro grupos foram muito reduzidos não ultrapassando, em nenhum caso, 0,25 ng/ml (Figura 11B). Esses resultados indicaram o predomínio de respostas celulares do tipo Th1 nos cães imunizados com a rLdccys1.

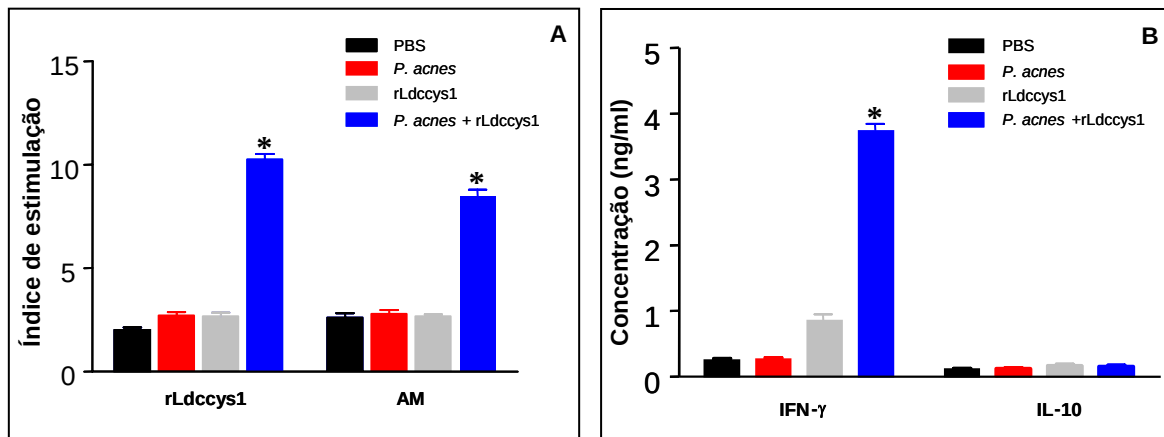


Figura 11: Proliferação de linfócitos de sangue periférico de cães imunizados com a rLdccys1 e reestimulados com o extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi* ou a rLdccys1 (A) e detecção de citocinas nos sobrenadantes das culturas desses linfócitos (B). A - Os asteriscos representam a diferença significativa entre o índice de estimulação dos linfócitos dos cães imunizados com a rLdccys1+ *P. acnes* e o dos controles ($P<0,05$). B – Para as dosagens das citocinas os sobrenadantes das culturas dos linfócitos foram utilizados à diluição de 1:4. Os resultados representam as médias de triplicatas e os desvios padrão não ultrapassaram 10% dos valores. Os valores mínimos considerados para as dosagens das citocinas foram: IFN- γ , 0,016 ng/ml; IL-10, 0,015 ng/ml. Os dados são representativos de um experimento de dois que apresentaram resultados semelhantes. O asterisco representa a diferença significativa entre a concentração de IFN- γ obtida no sobrenadante das culturas de linfócitos periféricos dos cães imunizados com a rLdccys1 + *P. acnes* reestimulados com a rLdccys1 e a dos controles ($P<0,05$).

7. Imunização ativa dos cães com a rLdccys1

7.1. Imunização dos cães com a rLdccys1 e desafio com a injeção intraperitoneal de amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Uma vez demonstrado que a rLdccys1 induz respostas celulares mediadas por linfócitos Th1, a próxima etapa do trabalho foi determinar se esse antígeno é capaz de proteger os cães contra o desafio com a *L. (L.) chagasi*. Doze cães foram selecionados para o experimento de imunização ativa. Os cães foram distribuídos em três grupos que receberam PBS (n=4); 250 µg da *P. acnes* (n=4); 150 µg da rLdccys1 juntamente com 250 µg da *P. acnes* (n=4). Todos os grupos receberam três doses de antígeno por via subcutânea com intervalo de 15 dias entre elas. Quinze dias após a última imunização todos os cães foram desafiados pela injeção intraperitoneal de 1×10^4 amastigotas de *L. (L.) chagasi* recém-isolados de baço de cães infectados, como descrito no item 3 de Materiais e Métodos.

Os animais controles que receberam PBS e *P. acnes* morreram 4 e 6 semanas, respectivamente, após o desafio. Dos 4 cães imunizados com a rLdccys1 mais a *P. acnes*, 3 sobreviveram dez semanas após o desafio (Figura 12).

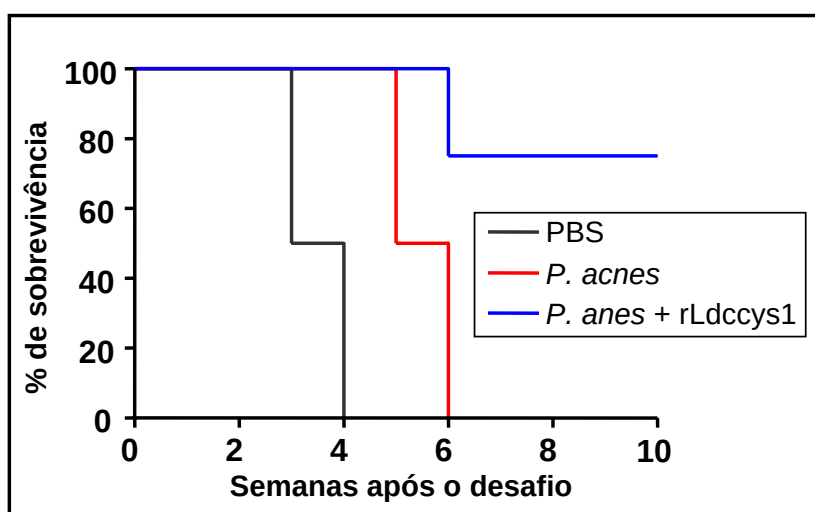


Figura 12: Sobrevivência dos cães imunizados com a rLdccys1 e infectados pela injeção intraperitoneal de 1×10^4 amastigotas de *L. (L.) chagasi*.

A análise das citocinas no soro dos animais imunizados e desafiados com a *L. (L.) chagasi* mostrou que os níveis de IL-10 nos três grupos de animais não apresentaram variação significativa após a administração dos antígenos. A concentração sérica média de IL-10 foi de 22 pg/ml durante todo o tempo em que os animais receberam PBS. Os cães do grupo *P. acnes* apresentaram a concentração média de 56 pg/ml de IL-10 no soro antes da imunização, tendo sido observado um pequeno aumento após a primeira imunização que se manteve em torno de 82 pg/ml até a última dose da *P. acnes*. O grupo imunizado com a rLdccys1 mais *P. acnes* mostrou um perfil de produção de IL-10 semelhante ao dos animais que receberam a *P. acnes*, sendo a concentração dessa linfocina de 123 pg/ml após a terceira imunização (Figura 13A). Após o desafio houve um aumento significativo da concentração de IL-10 sérica nos três grupos de animais, apresentando o grupo injetado com PBS a maior concentração dessa linfocina (408 pg/ml). Os grupos imunizados com a *P. acnes* ou a *P. acnes* + rLdccys1 após o desafio apresentaram níveis séricos de IL-10 de 217 pg/ml e 248 pg/ml, respectivamente (Figura 13 A).

A produção de IFN- γ manteve-se em níveis basais antes e após a administração de PBS ou da *P. acnes* e não ultrapassou a concentração de 20 pg/ml após a terceira dose (Figura 13B). No grupo imunizado com a rLdccys1 + *P. acnes* houve um aumento gradativo da produção de IFN- γ durante a imunização que foi de 1960 pg/ml após a terceira dose e aumentou para 2860 pg/ml uma semana após o desafio (Figura 13B).

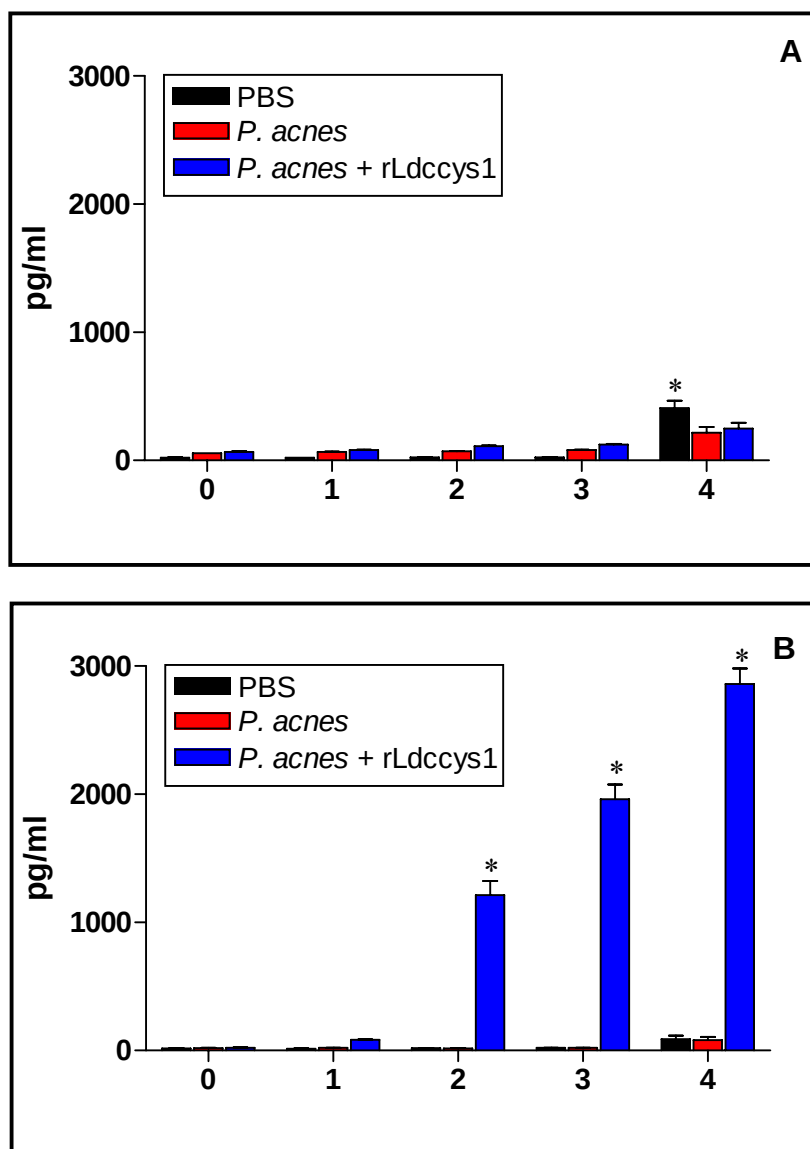


Figura 13: Análise do perfil de citocinas dos cães imunizados com a rLdccys1 e desafiados com a injeção intraperitoneal de 1×10^4 amastigotas de *L. (L.) chagasi*. Os níveis séricos de IL-10 (A) e IFN- γ (B) foram avaliados antes da administração dos antígenos (0), após a primeira (1), segunda (2) e terceira (3) doses e uma semana após o desafio (4). Os valores mínimos considerados para as dosagens das citocinas foram: IFN- γ , 0,016 ng/ml; IL-10, 0,015 ng/ml. O asterisco representa a diferença significativa entre os níveis de citocinas no soro dos animais dos diferentes grupos ($P < 0,01$).

A infecção dos animais após o desafio com a injeção intraperitoneal de amastigotas de *L. (L.) chagasi* foi avaliada pela contagem dos parasitas em cortes de fígado, baço, linfonodo poplíteo e pele. Foi também quantificada a carga parasitária em material isolado da medula óssea dos animais. Pode-se observar na Figura 14 que o número de amastigotas nos cães controles que receberam PBS ou apenas a *P. acnes* foi maior no fígado e baço, enquanto que na medula óssea e no linfonodo poplíteo esse número foi bem menor. Na pele dos animais que receberam PBS os amastigotas foram muito escassos e ausentes na pele dos imunizados com a *P. acnes*. Nos cães imunizados com a rLdccys1 a carga parasitária foi significativamente reduzida no fígado, baço e medula óssea comparada à dos controles e nenhum parasita foi observado no linfonodo poplíteo e na pele desses animais (Figura 14).

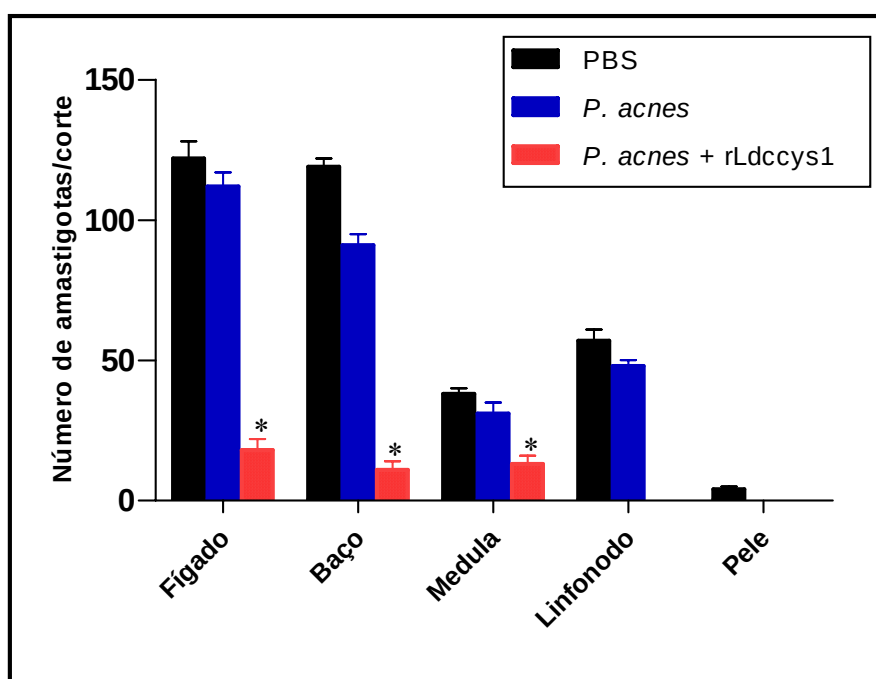


Figura 14: Estimativa da carga parasitária dos cães imunizados com a rLdccys1 e desafiados pela injeção intraperitoneal de 1×10^4 amastigotas de *L. (L.) chagasi*. As contagens dos amastigotas foram realizadas em 3 cortes de $0,5 \mu\text{m}$ de cada órgão corados pela hematoxilina-eosina e em esfregaços do material isolado da medula óssea dos animais. Os asteriscos representam a diferença significativa do número de parasitas encontrado nos cães imunizados com a rLdccys1 e nos controles ($P < 0,05$).

7.2. Imunização dos cães com a rLdcccys1 e desafio pela picada de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas com promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

7.2.1. Infecção dos flebotomíneos com a *Leishmania (Leishmania) chagasi*

O grau de infecção das fêmeas de *Lu. longipalpis* pela *L. (L.) chagasi* foi comparado submetendo-as à alimentação em cães naturalmente infectados com *L. (L.) chagasi* ou em alimentador artificial. Nesses experimentos 84 fêmeas de *Lu. longipalpis*, distribuídas em três grupos, como mostrado na Tabela 4, foram submetidas ao repasto sangüíneo em cães infectados com a *L. (L.) chagasi* e 89, também divididas em grupos de três, foram alimentadas artificialmente, como descrito no item 11.2.2 de Materiais e Métodos. Como pode ser observado na Tabela 4, a média da infecção das fêmeas do *Lu. Longipalpis* alimentadas em cães infectados foi de 6,86%, enquanto que a das fêmeas submetidas ao alimentador artificial foi de 42,74%.

Tabela 4: Avaliação da infectividade de fêmeas de *Lu. longipalpis* após repasto sangüíneo em cães infectados ou alimentadas artificialmente com sangue de cão heparinizado contendo promastigotas de *L. (L.) chagasi*.

	Fonte de infecção	
	Cães com LVC	Alimentador artificial
Grupo 1	6,67% (2/30)	46,42% (13/28)
Grupo 2	9,37% (3/32)	36,66% (11/30)
Grupo 3	4,54% (1/22)	45,16% (14/31)

7.2.2. Desafio com fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* infectadas com *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Um grupo de cães imunizados com a rLdccys1, de acordo com o esquema anterior, foi desafiado com a picada de fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas com *L. (L.) chagasi* por meio de alimentador artificial, como descrito. Os quatro cães do grupo que receberam PBS morreram sete semanas após o desafio. A sobrevivência dos quatro cães imunizados com a *P. acnes* foi de, no máximo, nove semanas após o desafio. Por outro lado, os seis cães imunizados com a rLdccys1 + *P. acnes* sobreviveram até 16 semanas após o desafio (Figura 15).

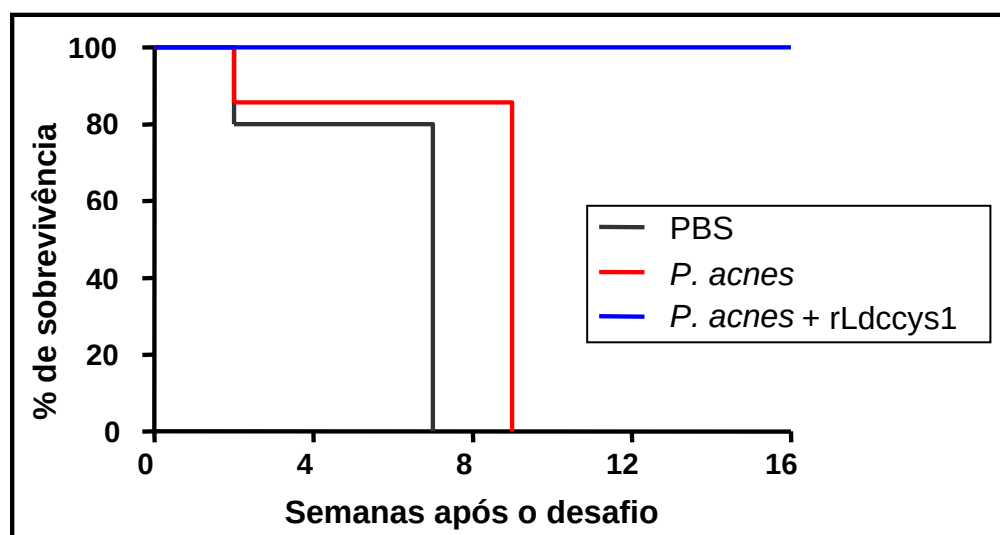


Figura 15: Sobrevivência dos cães imunizados com a rLdccys1 e desafiados pela picada de fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas em alimentador artificial com promastigotas de *L. (L.) chagasi*.

Semelhante aos resultados anteriormente obtidos no grupo dos cães imunizados com a rLdccys1 e desafiados pela injeção intraperitoneal de amastigotas de *L. (L.) chagasi*, a concentração de IL-10 no soro dos animais dos três grupos desafiados pela picada de *Lu. longipalpis* não apresentou diferenças significantes durante a imunização. Os cães do grupo PBS apresentaram a concentração de 64 pg/ml de IL-10 no soro e ela se manteve praticamente inalterada após as três doses de PBS. Antes do desafio, os animais dos grupos *P.*

acnes e rLdccys1 + *P. acnes* apresentaram uma concentração média de IL-10 de 128 pg/ml e 123 pg/ml, respectivamente. Após o desafio com a picada das fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas a concentração de IL-10 no soro dos animais dos três grupos apresentou aumento significativo. O grupo que recebeu PBS apresentou a maior concentração de IL-10, 982 pg/ml, enquanto que os grupos imunizados com a *P. acnes* e a rLdccys1 + *P. acnes* apresentaram 302 e 312 pg/ml de IL-10, respectivamente (Figura 16A). Comparando-se esses resultados com os apresentados pelos animais que receberam PBS e foram desafiados pela injeção de *L. (L.) chagasi*, o nível de IL-10 foi significativamente aumentado nos animais que receberam PBS e foram desafiados pela picada do flebotomíneo.

A concentração de IFN- γ nos grupos PBS e *P. acnes* foi mantida em níveis muito baixos durante a imunização, sendo essa concentração de 36 pg/ml após a terceira dose (Figura 16B). No grupo imunizado com a rLdccys1 + *P. acnes* houve um aumento crescente da concentração sérica de IFN- γ após cada imunização, atingindo a concentração de 1.218 pg/ml após a terceira dose e de 2.516 pg/ml após o desafio (Figura 16B).

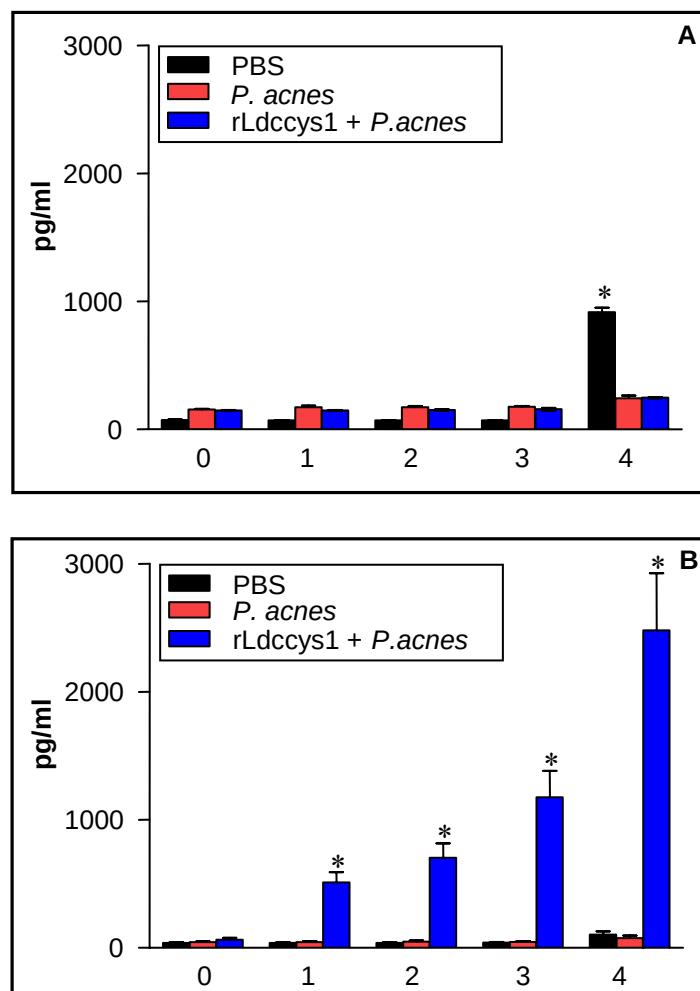


Figura 16: Dosagem de IL-10 (A) e IFN- γ (B) no soro dos cães imunizados e desafiados pela picada das fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas com *L. (L.) chagasi*. Os níveis de citocinas séricas foram medidos antes da primeira dose (0), após a primeira (1), segunda (2), terceira (3) doses e após uma semana do desafio (4). Os valores mínimos considerados para as dosagens das citocinas foram: IFN- γ , 0,016 ng/ml; IL-10, 0,015 ng/ml. O asterisco representa a diferença significativa entre os níveis de citocinas no soro dos diferentes grupos de animais ($P < 0,01$).

Para analisar a infecção dos animais após o desafio com as fêmeas de *Lu. longipalpis* foram preparados cortes de fígado, baço, linfonodo poplíteo e pele, assim como esfregaços do material isolado da medula óssea logo após a morte de cada animal dos grupos PBS e *P. acnes*. Os animais do grupo rLdccys1 + *P. acnes* foram sacrificados dezesseis semanas após o desafio e os mesmos órgãos foram analisados.

Semelhante aos resultados anteriores obtidos nos animais imunizados com a rLdccys1 e desafiados pela injeção intraperitoneal de amastigotas de *L. (L.) chagasi*, foi maior o número de amastigotas no fígado e baço dos cães controles que receberam PBS ou apenas a *P. acnes*, enquanto que na medula óssea e no linfonodo poplíteo o número encontrado foi bem menor. Na pele dos animais que receberam PBS o número de amastigotas foi muito pequeno e ausente nos cães imunizados com a *P. acnes*. Nos cães imunizados com a rLdccys1 não foram observados parasitas em nenhum dos órgãos analisados (Figura 17).

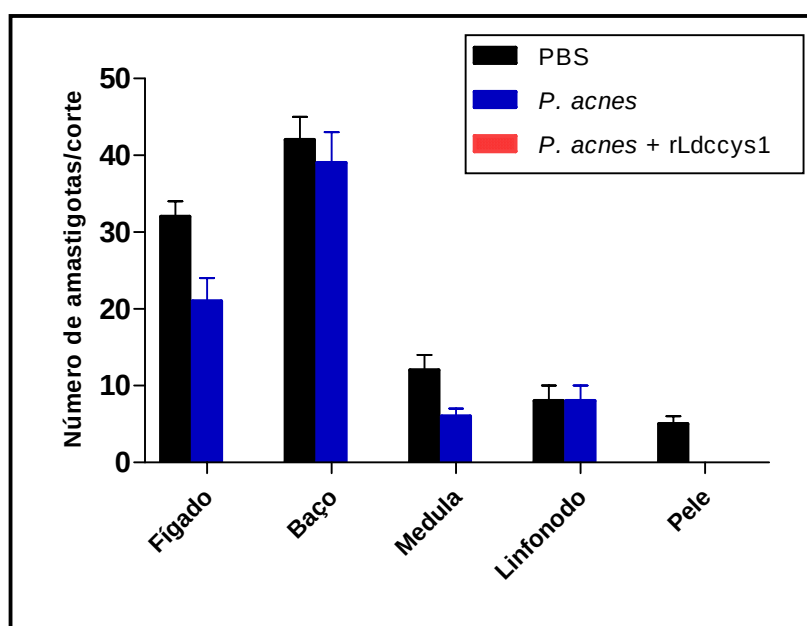


Figura 17: Estimativa da carga parasitária dos cães imunizados com a rLdccys1 e desafiados pela picada das fêmeas de *Lu. longipalpis*. A contagem dos amastigotas foram realizadas em 3 cortes de 0,5 μ m de cada órgão corados pela hematoxilina-eosina e em esfregaços do material isolado da medula óssea dos animais.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos vários pesquisadores têm concentrado esforços para identificar antígenos que possam ser utilizados como ferramenta para o diagnóstico imunológico da LV, assim como para a imunização protetora contra essa parasitose. Apesar dos avanços nas pesquisas, muitas vezes o diagnóstico da LV é feito unicamente pela demonstração do parasita em biópsia de material aspirado da medula ou linfonodo e a prevenção da doença se baseia no combate ao inseto vetor com aplicação de inseticidas associado à eutanásia de cães com diagnóstico positivo para a doença (Guerin et al, 2002). O presente trabalho avaliou a validade de utilizar uma cisteína proteinase recombinante de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, rLdccys1, em testes de ELISA e DTH para o diagnóstico da LV canina bem como em protocolos de imunização de cães saudáveis de uma área endêmica de calazar no Brasil, Teresina, Piauí.

Inicialmente a antigenicidade da rLdccys1 para a resposta imune humoral foi avaliada utilizando-se a proteína recombinante em ensaios de ELISA com soros de 10 cães naturalmente infectados com a *L.(L.) chagasi*. Os resultados mostraram que a reatividade da rLdccys1 é comparável à dos extratos de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) chagasi* até a diluição de 1:1.600 (Figura 6). Esses dados indicaram a validade de utilizar a rLdccys1 para a detecção de anticorpos nos soros de cães com LV, como previamente demonstrado pelo uso desse antígeno no diagnóstico sorológico da LV humana (Dias et al, 2005). A extensão dos ensaios de ELISA com a rLdccys1 a um grande número de soros de cães com LV, assim como com soros de cães com erliquiose, babesiose e doença de Chagas, mostrou a alta sensibilidade (98%) e especificidade (96%) desses testes (Figura 7 e Tabela 2). A comparação desses resultados com os obtidos com uma cisteína proteinase recombinante de *L. (L.) infantum*, rCPB, utilizada no sorodiagnóstico de cães com LV no Irã, mostrou que a sensibilidade dos ensaios com a rLdccys1 (98%) foi maior do que a observada com a CPB recombinante (76%). Além disso, a média dos valores de densidade óptica com a rLdccys1 foi de 1,55, enquanto que essa média foi de 0,29 com a rCPB (Rafati et al, 2003). Uma vez que a CPB possui 99% de identidade com a Ldccys1 (Dias et al, 2005), a diferença encontrada entre as médias de densidade óptica nos ensaios de ELISA comparando os dois antígenos pode estar associada à forma clínica da LV considerada em ambos os estudos. No trabalho de Rafati e colaboradores não houve discriminação entre os soros de cães sintomáticos e assintomáticos.

Assim, a média dos valores de densidade óptica apresentada com a rCPB pode ser devida à utilização dos soros principalmente dos animais assintomáticos. Essa conclusão é suportada pela média dos valores de absorbância obtidos com a rLdccys1 nos ensaios com os soros dos cães assintomáticos (0,36) (Figura 7). No entanto, é difícil comparar resultados obtidos em diferentes laboratórios.

A sensibilidade dos ensaios com a rLdccys1 é comparável à observada com outros antígenos utilizados em sorodignóstico de cães com LV, como o K39 recombinante (97%) testado em soros de cães no sul da Itália (Scalone et al, 2002) e a proteína quimérica PQ de *L. (L.) infantum* que apresentou 93% de sensibilidade quando utilizada com soros de cães com LV na Espanha (Soto et al, 1998). Além disso, o nível de sensibilidade com a rLdccys1 foi maior do que o registrado com o antígeno A2 de *L. (L.) donovani* (87%) (Carvalho et al, 2002). A especificidade da rLdccys1 foi alta quando se avaliaram os soros de cães com outras infecções encontradas nas áreas endêmicas de LV e comparável àquela obtida com as proteínas recombinantes previamente testadas (Soto et al, 1998; Carvalho et al, 2002; Scalone et al, 2002; Rosati et al, 2003). É também importante observar que o espectro dos valores de absorbância obtido com a rLdccys1 é maior que o obtido com os extratos de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) chagasi*. Enquanto 71% dos soros dos cães apresentaram valores de densidade óptica maiores que 1 com a rLdccys1, 57,5% e 60% desses soros mostraram valores mais baixos com os extratos de promastigotas e amastigotas, respectivamente. Portanto, a interpretação dos resultados pode ser facilitada com a utilização da rLdccys1 nos ensaios de ELISA.

As respostas de DTH com a rLdccys1 na LV canina corroboram os nossos achados prévios de que as respostas celulares induzidas pela rLdccys1 em humanos e cães com LV assintomática mostram o perfil de Th1, enquanto que nos sintomáticos houve a predominância de respostas Th2 (Pinheiro et al, 2005). A sensibilidade dos testes de DTH foi de 100% com ambos, rLdccys1 e o extrato de amastigotas de *L. (L.) chagasi*. Entretanto, as respostas celulares à rLdccys1 foram maiores que as induzidas pelo extrato dos amastigotas (Figura 8). Além disso, a rLdccys1 representa um antígeno mais seguro para o uso nas reações de DTH, desde que a análise histopatológica mostrou a predominância de áreas necróticas e hemorrágicas no sítio de aplicação do extrato dos amastigotas. Essas reações secundárias à aplicação do antígeno tendem a evoluir para a

formação de vesículas e ulcerações, como previamente observado quando concentrações crescentes de antígeno de *Leishmania* foram utilizadas nos testes de DTH (Weigle et al, 1991).

A diferença nas respostas imunes celular e humoral entre a LV canina assintomática e sintomática foi claramente observada pela correlação inversa quase perfeita ($r < -0,9$) encontrada durante o curso da LV canina (Figura 10). Esses dados corroboram resultados prévios de imunidade celular específica em cães assintomáticos naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* (Cabral et al, 1992; Pinelli et al, 1994). Esses resultados também estão de acordo com aqueles encontrados por Cardoso e colaboradores (1998) na região mais importante de LV canina de Portugal. Esses autores relatam que a prevalência estimada da LV canina foi maior nos cães assintomáticos quando avaliada pelos testes de DTH e contrastaram com a baixa prevalência observada quando o diagnóstico da LV foi realizado por sorologia ou cultura dos parasitas isolados de medula óssea. Nossos achados diferiram daqueles que não encontraram correlação entre a reação de DTH e as respostas humorais quando IgG total foi quantificada em cães sintomáticos e assintomáticos (Cardoso et al, 2007). Tal diferença pode ser devida à metodologia utilizada, pois a análise de IgG por esses autores foi feita por reação de aglutinação direta, enquanto que no presente trabalho os ensaios foram feitos por ELISA.

Os dados de imunização dos cães com a rLdccys1 mostraram que esse antígeno induz respostas celulares avaliadas após o reestímulo *in vitro* dos linfócitos periféricos dos animais imunizados com a rLdccys1 ou com o extrato total de amastigotas de *L. (L.) chagasi* (Figura 11). A análise das citocinas secretadas nessas culturas mostrou a produção significativa de IFN- γ e a ausência de IL-10, indicando resposta mediada por linfócitos Th1 nos animais imunizados com a rLdccys1. Esses resultados corroboram dados anteriores que mostraram o predomínio de respostas Th1 induzidas pela rLdccys1 em pacientes e cães com a forma assintomática de LV (Pinheiro et al, 2005). Na imunização dos cães com a rLdccys1 é importante também ressaltar o papel do adjuvante utilizado. A *P. acnes*, quando administrada como adjuvante, estimula a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-6 e TNF- α e principalmente IL-12 e IL-18 que por sua vez induzem a síntese de IFN- γ , direcionando a resposta imune para o perfil Th1

(Matsui et al, 1997; Tarleton et al, 2000, Braga et al, 2003). Nas leishmanioses a *P. acnes* foi utilizada em experimentos de imunização ativa com antígenos de *Leishmania*, tendo conferido proteção contra a leishmaniose cutânea (Scott et al, 1987; Scott et al, 1990; Soong et al, 1995), assim como contra a infecção pela *L. (L.) donovani* (Jaffe et al, 1990; White e McMahon-Pratt, 1990). Dados de imunização com a Ldccys1 nativa de *L. (L.) chagasi* juntamente com a *P. acnes* mostraram que a proteção contra a infecção homóloga em modelo murino foi comparável à obtida quando os animais foram imunizados com a Ldccys1 mais o adjuvante completo de Freund (Pinto et al, 2000). Respostas parcialmente protetoras mediadas por linfócitos Th1 também foram observadas em camundongos BALB/c imunizados com a rLdccys1 e desafiados com a *L. (L.) chagasi* e o grau de proteção conferido pela rLdccys1 foi semelhante quando se utilizou BCG ou *P. acnes* como adjuvantes (Ferreira et al, 2008).

A vacinação dos cães com a rLdccys1 seguida do desafio pela injeção intraperitoneal de amastigotas de *L. (L.) chagasi* induziu significativa produção de IFN- γ (2.860 pg/ml), enquanto que não houve secreção de IL-10 nesses animais (Figura 13). A sobrevivência desse grupo foi alta, pois 3 dos 4 cães imunizados estavam vivos até dez semanas após o desafio (Figura 12). Por outro lado, os animais dos grupos controles não apresentaram níveis detectáveis de IFN- γ . Em relação à IL-10, os resultados mostraram que, mesmo baixa, houve produção significativa dessa linfocina nos controles que receberam PBS e que foram os primeiros a morrer. Provavelmente a concentração de IL-10 nesses animais tenha alcançado níveis muito mais altos quatro semanas após o desafio, porém essa linfocina foi avaliada uma semana após a infecção dos animais. Os cães imunizados com a *P. acnes* não apresentaram níveis significantes de IL-10 uma semana após o desafio e sobreviveram duas semanas a mais que o grupo que recebeu PBS. Provavelmente também nesse grupo os níveis de IL-10 estavam aumentados seis semanas após o desafio, quando os animais morreram (Figura 12). Quanto ao desafio dos animais nesse experimento, é importante ressaltar que o número de parasitas inoculado pela injeção de macerado de baço de cão com LV foi provavelmente superestimado (1×10^4 amastigotas) em relação à infecção natural. Estima-se que para 0,1 μ l de sangue ingerido cada flebotomíneo se infecte com cerca de 200 promastigotas de *Leishmania* e essa concentração é diretamente proporcional à carga parasitária inoculada durante o repasto

sanguíneo (Warburg & Schlein, 1986). Além disso, é possível a contaminação dos animais desafiados com outros patógenos presentes nos extratos de parasitas retirados do baço de cães da área endêmica. Esses fatores talvez expliquem a morte prematura dos animais dos grupos controle. A avaliação da carga parasitária por PCR em tempo real e o monitoramento dos sinais e sintomas clínicos da doença mostrou a estreita associação entre a carga parasitária e as manifestações clínicas da LV canina (Manna et al, 2009). Essa associação também foi evidenciada pela imunização de cães com o antígeno A2 recombinante de *L. (L.) donovani* que conferiu proteção parcial nos animais contra o desafio com promastigotas de *L. (L.) chagasi* por via endovenosa. Nesses experimentos foi observada a correlação entre os cães que desenvolveram sintomas e a presença de DNA de *Leishmania* no sangue periférico (Fernandes et al, 2008).

A avaliação da carga parasitária dos animais imunizados com a rLdccys1 mostrou que eles apresentaram quatro vezes menos parasitas no fígado e no baço e a metade do número de parasitas na medula óssea comparados aos controles. Além disso, não foram encontrados amastigotas na pele e linfonodo poplíteo dos animais imunizados com a rLdccys1, mostrando que, embora infectados, esses animais foram capazes de controlar o curso da doença. Esses achados sugerem que o perfil dos animais imunizados com a rLdccys1 é semelhante ao dos cães oligossintomáticos cujos linfócitos secretaram IFN- γ e IL-10 quando reestimulados *in vitro* com a rLdccys1 (Pinheiro et al, 2005). Dados semelhantes de respostas imunes protetoras mediadas por linfócitos Th1 foram obtidos pela imunização com os genes codificadores das cisteína proteinases CPA e CPB de *L. (L.) infantum* seguida pelo reforço com as proteínas recombinantes. Diferente dos achados do presente trabalho, todos os cães vacinados sobreviveram um ano após a vacinação e não apresentaram parasitas na medula óssea. Considerando-se que a Ldccys1 possui 99% de identidade com a CPB de *L. (L.) infantum*, o maior tempo de sobrevivência dos cães nesse experimento comparado ao dos animais imunizados com a rLdccys1 pode estar relacionado à via de inoculação dos parasitas (endovenosa) e à forma dos parasitas utilizada para o desafio dos animais (promastigotas). A menor infectividade dos cães imunizados com o DNA das cisteína proteinases de *L. (L.) infantum* é reforçada pelo fato de que um ano após o desafio todos os controles

também sobreviveram apesar de 3 de 4 desses animais terem apresentado parasitas na medula óssea (Rafati et al, 2005). Outro ponto importante é que a vacinação gênica seguida de um reforço com a proteína recombinante pode resultar em maior proteção comparada à vacinação apenas com a proteína. Isso é corroborado pelos dados que mostraram que camundongos BALB/c imunizados com o gene *Ldccys1* apresentaram proteção dez vezes maior contra o desafio com a *L. (L.) chagasi* do que os animais imunizados com a rLdccys1 (Ferreira et al, 2008).

Os dados da literatura relatam que no máximo 7,14% das fêmeas de *Lu. longipalpis* em áreas endêmicas de LV canina podem estar infectadas (Sherlock, 1996). Os experimentos de alimentação artificial das fêmeas de flebotomíneos com sangue heparinizado de cão contendo promastigotas de *L. (L.) chagasi* resultaram na infecção de 36 a 46% desses insetos. Esse índice é cerca de seis vezes maior que o obtido pela alimentação dos flebotomíneos em cães naturalmente infectados com a *L. (L.) chagasi* (Tabela 4). Uma vez que para o desafio cada cão foi exposto à picada de 50 flebotomíneos com alta taxa de infectividade, pode-se concluir que a carga de parasitas recebida pelos cães imunizados foi maior do que a inoculada pela picada do vetor na infecção natural. No presente trabalho, os cães imunizados com a rLdccys1 e desafiados com a picada das fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas sobreviveram dezesseis semanas após o desafio, além de nenhum parasita ter sido observado nos tecidos analisados. Por outro lado, os controles morreram após sete (PBS) e nove semanas (*P. acnes*) do desafio. Embora o número de cães utilizados no presente trabalho seja limitado, os resultados de imunização com a rLdccys1 são comparáveis aos obtidos com a imunização de cães em áreas endêmicas de LV canina com o ligante de fucose-manose de *L. (L.) donovani* associada a saponina (Leishmune[®]) que mostraram que 92 a 100% dos cães imunizados sobreviveram à infecção pela *L. (L.) chagasi* (Silva et al, 2001; Borja-Cabrera et al, 2002; Nogueira et al, 2005).

Nos cães imunizados com a rLdccys1 os dados de sobrevivência e carga parasitária são compatíveis com o predomínio de respostas Th1, como indicado pela detecção de IFN- γ no soro dos animais imunizados e a ausência de IL-10. É importante ainda observar que os níveis de IFN- γ foram significantes a partir da administração da terceira dose da rLdccys1 e aumentaram ainda mais após o

desafio pela picada dos flebotomíneos. Esses dados podem indicar o sinergismo entre a resposta imune aos antígenos salivares de *Lu. longipalpis* e a rLdccys1, como tem sido demonstrado com antígenos de *Leishmania* utilizados juntamente com o extrato de glândula salivar para a imunização de cães (Giunchetti et al, 2008). Ao contrário, os animais controles apresentaram níveis basais de IFN- γ e elevada carga parasitária no fígado e baço, bem como parasitas na medula e linfonodos, fortemente indicando o desvio da resposta imune para Th2 nesses animais que levou à exacerbação da doença. O mesmo padrão de citocinas anteriormente observado nos cães imunizados com a rLdccys1 e desafiados pela injeção intraperitoneal de amastigotas de *L. (L.) chagasi* foi encontrado nos soros dos animais imunizados e desafiados com a picada das fêmeas de *Lu. longipalpis*. No entanto, a concentração de IL-10 no soro dos animais que receberam PBS e foram desafiados com a picada dos flebotomíneos foi significativamente maior comparada à encontrada nos animais imunizados e desafiados pela injeção intraperitoneal de amastigotas de *L. (L.) chagasi* (982 pg/ml e 408 pg/ml, respectivamente) (Figuras 13 e 16). Esse aumento pode ser devido ao efeito de componentes da glândula salivar do flebotomíneo, pois dados da literatura mostram que a saliva de *Lu. longipalpis* estimula a produção de IL-10, levando à exacerbação da infecção por *Leishmania* (Norsworthy et al, 2004).

A carga parasitária dos cães imunizados e desafiados com a picada das fêmeas dos flebotomíneos infectadas com a *L. (L.) chagasi* pode ser correlacionada com a maior sobrevivência dos animais nesse experimento. Os cães dos grupos controles morreram após sete e nove semanas da infecção, enquanto que os desafiados com a injeção dos amastigotas morreram 4 e 6 semanas após o desafio. O número de parasitas foi significativamente reduzido no fígado, baço, linfonodo poplíteo e na medula óssea dos controles desafiados pela picada do flebotomíneo comparado ao dos controles desafiados pela injeção de amastigotas de *L. (L.) chagasi*. Por outro lado, todos os cães imunizados com a rLdccys1 + *P.acnes* e desafiados pela picada das fêmeas de *Lu. longipalpis* infectadas sobreviveram. Essa sobrevivência foi maior do que a dos animais imunizados e desafiados pela injeção dos amastigotas, além de esses animais não apresentarem sintomatologia para a LV e parasitas em nenhum dos órgãos analisados. Novamente, esses dados corroboram os achados da literatura que relacionam a menor carga parasitária a manifestações clínicas mais tardias

(Manna et al, 2009) e a potencialização do efeito imunoestimulante dos antígenos de *Leishmania* quando administrados com antígenos salivares de *Lutzomyia* (Morris et al, 2001; Costa et al, 2004; Valenzuela et al, 2004).

Analizados em conjunto, os dados do presente trabalho indicam que a rLdccys1 de *L. (L.) chagasi* pode ser útil para o diagnóstico da LV canina por ensaio de ELISA e DTH, permitindo a discriminação das formas clínica e subclínica da doença, um parâmetro importante para o controle da LV canina nas áreas endêmicas. Quanto aos resultados de imunização ativa, demonstrou-se que a rLdccys1 induz significativa resposta celular protetora nos cães imunizados e desafiados com a *L. (L.) chagasi*. Essa proteção foi maior quando os animais foram imunizados com a rLdccys1 e desafiados pela picada do vetor comparada à observada nos cães desafiados pela injeção intraperitoneal dos amastigotas de *L. (L.) chagasi*. Apesar de o pequeno número de animais testados, esse achado abriu a perspectiva de estender a imunização com a rLdccys1 a um número maior de cães nas regiões endêmicas de LV e avaliar a proteção conferida nos animais imunizados a longo prazo, assim como o impacto na incidência da doença.

ABSTRACT

A recombinant protein, rLdccys1, produced by expression of the gene encoding a 30 kDa cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi*, was used to detect specific antibodies in serum by enzyme-linked immunosorbent assays and to test for reactivity in delayed-type hypersensitivity (DTH) responses of dogs from an endemic region of visceral leishmaniasis (VL), Teresina, Piauí State, Brazil. The recombinant protein was also used for immunization of dogs and evaluation of its possible protective role against *L. (L.) chagasi* infection.

The sensitivity for detection of specific antibodies to *L. (L.) chagasi* using rLdccys1 and lysates from *L. (L.) chagasi* promastigotes and amastigotes was 96%, 68%, and 69%, respectively. No cross reactivity between rLdccys1 and Chagas disease was observed, and little reactivity was found with sera from dogs with babesiosis and ehrlichiosis. The specificity of ELISA assays using rLdccys1, lysates from *L. (L.) chagasi* promastigotes and amastigotes was 96%, 69%, and 68%, respectively.

DTH responses were determined after subcutaneous injection of rLdccys1 or *L. (L.) chagasi* amastigote extract and the induration area was measured at 24, 48 and 72 h after injection. All asymptomatic dogs showed a positive intradermal response to rLdccys1 (10 mm) which peaked at 48 h, whereas no significant reactivity to the recombinant antigen was found in the symptomatic group. DTH responses to rLdccys1 were higher than those induced by amastigote extract. Histological analysis of the intradermal induration showed a predominance of necrotic and hemorrhagic areas in sections from asymptomatic dogs injected with *L. (L.) chagasi* amastigote extract, whereas a typical granulomatous reaction mediated by mononuclear cells was observed in sections from asymptomatic animals injected with rLdccys1. Data analysis from ELISA and DTH assays with rLdccys1 and *L. (L.) chagasi* amastigote extracts showed that humoral and cellular responses were inversely correlated during the development of canine VL.

Cellular immune responses induced by the recombinant antigen were evaluated after immunization of dogs with rLdccys1 plus *Propionibacterium acnes*. Peripheral blood mononuclear cells isolated from rLdccys1-immunized dogs showed significant stimulation indexes after *in vitro* incubation with either rLdccys1 or *L. (L.) chagasi* amastigote extracts. Cytokine dosages in the supernatants from lymphocyte cultures showed significant levels of IFN- γ , whereas IL-10 was not detected.

Whereas 3 from 4 dogs immunized with rLdccys1 plus *P. acnes* and challenged by intraperitoneal injection of 1×10^4 *L. (L.) chagasi* amastigotes survived ten weeks after challenge, control dogs which received either PBS or *P. acnes* died after four and six weeks, respectively. The load of *L. (L.) chagasi* amastigotes in spleen, liver, and bone marrow from rLdccys1-immunized dogs was significantly reduced in comparison to that of non immunized controls. A significant concentration of IFN- γ and basal levels of IL-10 were detected in sera from dogs immunized with rLdccys1.

All dogs immunized with rLdccys1 plus *P. acnes* and challenged by the bite of *L. (L.) chagas* infected *Lutzomyia longipalpis* survived until sixteen weeks after challenge, whereas control dogs injected with PBS or *P. acnes* died after seven and nine weeks, respectively. Control dogs showed a significant number of *L. (L.) chagasi* amastigotes in liver and spleen, but no parasites were found in rLdccys1-immunized dogs. During immunization with rLdccys1 there was an increase of serum levels of IFN- γ in the immunized dogs that peaked one week after challenge. In contrast, a very low concentration of IL-10 was detected in these animals.

Overall, these findings indicate that *L. (L.) chagasi* recombinant cysteine proteinase is potentially useful for diagnosis and immunoprophylaxis of canine VL. We believe that results obtained open perspectives for immunization of dogs in the field and evaluation of the impact on the disease incidence.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 1991; 13:537-50.

Alberio SO, Dias SS, Faria FP, Mortara RA, Barbiéri CL, Haapalainen EF. Ultrastructural and cytochemical identification of megasome in *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Parasitol Res.** 2004; 92: 246-254.

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Vet Parasitol.** 2005; 127:227-232.

Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggie J, Rodríguez F. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 1994; 88: 371–378.

Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, Alonso C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. **Acta Trop.** 1996; 62: 45-56.

Araújo MS, de Andrade RA, Sathler-Avelar R, Teixeira-Carvalho A, Andrade MC, Vianna LR, Mayrink W, Reis AB, Malaquias LC, Mello MN, Martins-Filho OA. T-cell-derived cytokines, nitric oxide production by peripheral blood monocytes and seric anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG subclass patterns following immunization against canine visceral leishmaniasis using Leishvaccine and Leishimmune®. **Vaccine.** 2009; 27: 1008-1017.

Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson Jr WD. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** 1986; 154: 1003-1011.

Baleeiro CO, Paranhos-Silva M, dos Santos JC, Oliveira GG, Nascimento EG, de Carvalho LP, dos-Santos WL. Montenegro's skin reactions and antibodies against

different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. **Vet Parasitol.** 2006; 139: 21-28.

Barbosa de Deus R, Mares Guia ML, Nunes AZ, Costa KM, Junqueira RG, Mayrink W, Genaro O, Tavares CAP. *Leishmania major* like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 2002; 9: 1356– 1361.

Barbiéri CL, Doine AI, Freymüller E. Lysosomal depletion in macrophages from spleen and foot lesions of *Leishmania*-infected hamster. **Exp Parasitol.** 1990; 71: 218-228.

Borja-Cabrera GP, da Silva VO, da Costa RT, Barbosa Reis A, Mayrink W, Genaro O, Palatnik-de-Sousa CB. The FML-ELISA assay in diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1999; 61: 296-301.

Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Long lasting protection against canine Kala-Azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). **Vaccine.** 2002; 20: 3277-3284.

Borja-Cabrera GP, Santos FN, Bauer FS, Parra LE, Menz I, Morgado AA, Soares IS, Batista LM, Palatnik-de-Sousa CB. Immunogenicity assay of the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine.** 2008; 26: 4991-4997.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Vet Immunol Immunopathol.** 1997; 59:21-30.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 1976; 72: 248-254.

Braga EG, Ananias RZ, Mussalem JS, Squaiella CC, Longhini ALF, Mariano M, Travassos LR, Longo-Maugeri IM. Treatment with *Propionibacterium acnes* modulates the late phase reaction of immediate hypersensitivity in mice. **Immunol Lett**, 2003; 88: 163-169.

Brodskyn CI, Gome RB, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira CI, Barral A, Barral-Neto M, Valenzuela J. Immunization with cDna from *Lutzomyia longipalpis* salivary protein glands protects hamsters from infection by *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**. 2005; 73: 121-127.

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

Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Vet. Parasitol**. 1998; 79: 213–220.

Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. **Vet. Parasitol**. 1998; 79: 213–220.

Cardoso L, Schallig HD, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Vet Immunol Immunopathol**. 2007; 117: 35-41.

Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Neto M, Badaró R, Rocha H, Johnson WDJ. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **J. Infect. Dis.** 1992; 165: 535-540.

Carvalho FAA, Charest H, Tavares CAP, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 2002; 43: 289–295.

Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.** 2005; 103:67-75.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet Rec.** 1997; 21:539-543.

Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986. **Rev. Saúde Pública São Paulo.** 1990; 24: 361-372.

Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 2001; 34: 223-228.

Costa CHN, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, Satoskar A, Dissanayake S, Santos RS, Silva MR, Shaw JJ, David JR, Maguire JH. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi* **Am J Trop Med Hyg.** 2002; 66:334-347.

Costa DJ, Favali C, Clarêncio J, Afonso L, Conceição V, Miranda JC, Titus RG, Valenzuela J, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn CI. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect Immun.** 2004; 72: 1298-1305.

Da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, de Souza EP, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN). **Vaccine**. 2000; 19:1082-92.

Das L, Datta N, Bandyopadhyay S, Das PK. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. **J Immunol**. 2001; 166: 4020-4028.

De Luna R, Vuotto ML, Ielpo MT, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**. 1999; 70:95-103.

Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. **Parasite Immunol**. 1995; 17:451-458.

Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Ann Trop Med Parasitol**. 2003; 1:3-15.

Dias SS. Tese de Doutorado - Curso de Pós Graduação em Microbiologia e Imunologia - Escola Paulista de Medicina. São Paulo: 2004.

Dias SS, Pinheiro PHC, Katz S, Santos MRM, Barbiéri CL. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of American visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 2005; 72:126-132.

Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falketo A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis**. 1997; 25: 1240-1242.

Dubois SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, Rivas L, Pan AA, Traub-Czeco Y, Souza W, McMahon-Pratt D. The biosynthesis, processing and

immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinase. **Mol Biochem Parasitol.** 1994; 68: 119-132.

Eakin AE, Mills AA, Harth G, McKerrow JH, Craik CS. The sequence, organization and expression of the major cysteine proteinase (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem.** 1992; 267: 7411-7420.

El-Amin EM, Wright EP, Vlug A. Characterization of the humoral immune response in Sudanese leishmaniasis: specific antibody detected by class and subclass specific reagents. **Clin. Exp. Immunol.** 1986; 64: 14–19.

Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Luiz Tafuri W, Resende Dde M, Hermont V, Abrantes Cde F, Gazzinelli RT. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. **Vaccine.** 2008; 26: 5888-5895.

Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Rodríguez A, Rutten VP, Hoek A, Ramis A, Alberola J, Ferrer L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 2005; 107: 163–169.

Ferreira JH, Gentil LG, Dias SS, Fedeli CE, Katz S, Barbiéri CL. Immunization with the cysteine proteinase Ldcccys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcccys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine.** 2008; 26: 677-685.

Franke CR, Ziller M, Staubacher C. Impact of the El Nino/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. **Emerging Infectious Disease.** 2002; 8: 914-917.

Fujiwara RT, Vale AM, França da Silva JC, da Costa RT, Quetz Jda S, Martins Filho OA, Reis AB, Corrêa Oliveira R, Machado-Coelho GL, Bueno LL, Bethony JM, Frank G, Nascimento E, Genaro O, Mayrink W, Reed S, Campos-Neto A. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1)

potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. **Vet Res.** 2005; 36: 827-838.

FUNASA - **Boletim Eletrônico Epidemiológico** [on line]. Ano 2, nº 06 Brasília-DF: 2002. Disponível em URL: <http://www.funasa.gov.br/sitefunasa/pub/pub00.htm>.

Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Roatt BM, de Oliveira Aguiar-Soares RD, Coura-Vital W, de Abreu RT, Malaquias LC, Gontijo NF, Brodskyn C, de Oliveira CI, Costa DJ, de Lana M, Reis AB. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine.** 2008; 26:623-638.

Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, de Oliveira CI, Miranda JC, Elnaiem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2008;105:7845-7850.

Gomes YM, Cavalcanti MP, Lira, RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet. J.** 2008; 175: 45–52.

Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantedosi D, De Luna R, Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, Oliva G. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. **Vaccine.** 2005; 23: 5245-5251.

Guerín PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK, Bryceson ADM. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Infectious Diseases.** 2002; 2: 494-501.

Harith AE, Kolk AHJ, Kager PA, Leeuwenburg J, Faber FJ, Muigai R, Kiugu S, Laarman JJ. Evaluation of a new developed direct agglutination test (DAT) for

serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1987; 81: 603–606.

Iniesta L, Gállego M, Portús M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Vet Immunol Immunopathol.** 2005; 103:77-81.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Estado do Piauí.** 2002. Disponível em URL: <http://www.ibge.com.br/estadosat/perfil.php?sigla=pi>.

Jaffe CL, Rachamim N, Sarfstein R. Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis. **J Immunol.** 1990; 144: 699-706.

Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. **Vet Immunol Immunopathol.** 2001; 79: 273-284.

Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra M, Gonçalves RB, Hottin G, Papierok G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. **Vaccine.** 2005; 23: 2825-2840.

Lemesre JL, Holzmuller P, Gonçalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, Papierok G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. **Vaccine.** 2007; 25: 4223-4234.

Manna L, Reale S, Vitale F, Gravino AE. Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. **Res Vet Sci.** 2009; [in press].

Martínez-Moreno A, Moreno T, Martínez-Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.** 1995; 48:209-220.

Marzochi MCA, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi Júnior G, Momen H, Pacheco S, Sabroza PC, De Souza MA, Rangel Júnior FB. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical, parasitological, therapeutical, and epidemiological findings (1977-1983). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1985; 80:349-357.

Matsui, K, Yoshimoto, T, Tsutsui, H, *et al*: *Propionibacterium acnes* treatment diminishes CD4⁺ NK1.1⁺ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. **J Immunol.** 1997; 159: 97–106.

Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today.** 2000; 16: 188–189.

McKerrow JH. Parasite proteases. **Exp Parasitol.** 1989; 68: 111-115.

Michalsky EM, Fortes-Dias CL, Pimenta PF, Secundino NF, Dias ES. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 2002; 44: 255-259.

Molano I, Alonso MG, Mirón C, Redondo E, Requena JM, Soto M, Nieto CG, Alonso C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. **Vet Immunol Immunopathol.** 2003; 92:1-13.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1994; 88: 491–493.

Morris RV, Shoemaker CB, David JR, Lanzaro GC, Titus RG. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. **J Immunol.** 2001; 167: 5226-5530.

Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE, Coombs GH. The multiple *cpb* cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. **J Biol Chem.** 1997; 272: 14285-14293.

Mundodi V, Somanna A, Gedamu L. Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine proteinase genes of *Leishmania donovani* complex. **Gene.** 2002; 282: 257-265.

Nascimento MDO, Souza EC, da Silva LM, Leal PC, Cantanhede KL, Bezerra GF, Viana GM. Prevalence of infection by *Leishmania chagasi* using ELISA (rK39 and CRUDE) and the Montenegro skin test in an endemic leishmaniasis area of Maranhão, Brazil. **Cad Saude Publica.** 2005; 21:1801-1807.

Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Miró NC, Soto M, Alonso C, Navarrete I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 1999; 67:117–130.

Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, Xu Z, Chu HJ, Palatnik-de-Sousa CB, Luvizotto MC. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. **Vaccine.** 2005; 23:4805-4810.

Norsworthy NB, Sun J, Elnaïem D, Lanzaro G, Soong L. Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infect Immun.** 2004; 72: 1240-1247.

Omara-Opyene AL, Gedamu L. Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani chagasi*. **Mol Biochem Parasitol**. 1997; 90: 247-267.

Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Mitolo V, Sisto M, Fasanella A, Trotta T, Bertani F, Consenti B, Brandonisio O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 2001; 24:187-195.

Parra LE, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Souza LO, Palatnik-de-Sousa CB, Menz I. Safety trial using the Leishmune vaccine against canine visceral leishmaniasis in Brazil. **Vaccine**. 2007; 25: 2180-2186.

Pascalis H, Lavergne A, Bourreau E, Prévot-Linguet G, kariminia A, Pradinaud R, Rafati S, Launois P. Th1 cell development induced by cysteine proteinases A and B in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. **Infect Immun**. 2003; 71: 2924-2926.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin Infect Dis**. 1996; 22:1-13.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun**. 1994; 62: 229–235.

Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJ, Rutten VP, Gebhard D, del Real G, Ruitenber EJ. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur J Immunol**. 1995; 25:1594-1600.

Pinelli E, Rutten VP, Bruysters M, Moore PF, Ruitenber EJ. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect Immun**. 1999; 67:237-243.

Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenberg EJ, Rutten VP. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet Parasitol.** 2000; 92:181-189.

Pinheiro PHC, Dias SS, Eulálio K, Mendonça IL, Katz S, Barbiéri CL. Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. **Infect. Immun.** 2005; 73: 3787-3789.

Pinto AR, Beyrodt CGP, Lopes RAM, Barbiéri CL. Identification of a 30 kDa antigen from *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes implicated in protective cellular responses in a murine model. **Int.J. Parasitol.** 2000; 30: 599-607.

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clin Vaccine Immunol.** 2007; 4:544-548.

Pupkins ME, Tetley L, Coombs GH. *Leishmania mexicana*: amastigotes hydrolases in unusual lysosomes. **Exp Parasitol.** 1986; 62: 29

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.** 2001; 183:1421-1424.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.** 2003; 91:161-168.

Rafati S, Baba AA, Bakhshayesh M, Vafa M. Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. **Clin Exp Immunol.** 2000; 120: 134-138.

Rafati S, Salmanian AH, Taheri T, Vafa M, Fasel N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. **Vaccine.** 2001; 19: 3369-3375.

Rafati SW, Nakhaee A, Taheri T, Ghashghaii A, Salamian AH, Jimenez M, Mohebbali M, Masina S, Fasel N. Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. **Exp. Parasitol.** 2003; 103: 143-151.

Rafati S, Nakhaee A, Taheri T, Taslimi Y, Darabi H, Eravani D, Sanos S, Kaye P, Taghikhani M, Jamshidi S, Rad MA. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine.** 2005; 23: 3716-3725.

Rafati S, Zahedifard F, and Nazgouee F. Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. **Vaccine.** 2006; 24: 2169-2175.

Rami M, Atarhouch T, Dakkak A. Identification of two highly performing *Leishmania infantum* antigens for serodiagnosis of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** 2005; 134: 25-31.

Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. **Vaccine.** 2003; 21: 2474-2484.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin Exp Immunol**. 2006; 146:303-311.

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Lopez-Fuertes L, Timon M, Altet L, Sollano-Gallego L, Sanchez-Robert E, Francino O, Alberola J. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**. 2007; 25: 7962-7971.

Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E, Gradoni L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**. 2003; 10:1153-1156.

Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol Biochem Parasitol**. 2002; 120: 1-21.

Sakanari JA, Nadler SA, Chan VJ, Engel JC, Leptak C, Bouvier J. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine proteinase genes with those of other trypanosomatids. **Exp Parasitol**. 1997; 85: 63-76.

Santos FN, Borja-Cabrera GP, Miyashiro LM, Grechi J, Reis AB, Moreira MA, Martins Filho OA, Luvizotto MC, Menz I, Pessôa LM, Gonçalves PR, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. **Vaccine**. 2007; 25: 6176-6190.

Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**. 2002; 88:21-30.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Parasitol.** 2002; 104: 275-285.

Schallig HDFH, Schoone GJ, Beijer EGM, Kroom CCM, Hommers M, O'zbek Y, O'zensoy S, Silva ES, Cardoso LM, Silva ED. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti *Leishmania* antibodies in dogs. **Vet. Parasitol.** 2002; 109: 1–8.

Scott P, Pearce E, Natovitz P, Sher A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. **J Immunol.** 1987; 139:3118-3125.

Scott P, Caspar P, Sher A. Protection against *Leishmania major* in BALB/c mice by adoptive transfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes. **J Immunol.** 1990; 144:1075-1079.

Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde - **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6ª edição ampliada, Brasília-DF: 2005. Disponível em URL: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf.

Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan VJ, Engel JC, Bogoy M, Russel DG, Sakanari JA, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proc Natl Acad Sci.** 1999; 96: 11015-11022.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) – Ministério da Saúde, Brasília-DF: 2008. Disponível em URL: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1996; 91: 671-683.

Silva ES, Gontijo CM, Pacheco RS, Fiuza VO, Brazil RP. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2001; 96: 285-291.

Skeiky YAW, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Crane RT, Campos-Neto A, Reed SG. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL[®] adjuvant. **Vaccine**. 2002; 20: 3292-3303.

Soares RMA, Santos ALS, Bonaldo MC, Andrade AFB, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. **Exp Parasitol**. 2003; 104: 104-112.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Vet Parasitol**. 2000; 90:37-45.

Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. **J Biol Chem**. 2002; 277: 25305-25312.

Soong L, Duboise SM, Kima P, McMahon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. **Infect Immun**. 1995; 63:3559-3566.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**. 1996; 106: 454-461.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **J Clin Microbiol**. 1998; 36:58-63.

Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol.** 2000; 165: 1520-1525.

Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? **Am Trop Med Hyg.** 1995; 52: 287-292.

Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JM. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J Exp Med.** 2001; 194: 331-342.

Valenzuela JG, Garfield M, Rowton ED, Pham VM. Identification of the most abundant secreted proteins from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, vector of *Leishmania chagasi*. **J Exp Biol.** 2004; 207: 3717-3729.

Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L, Dugas B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob Agents Chemother.** 1996; 40:253-256.

Warburg A, Schlein Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. **Am J Trop Med Hyg.** 1986; 35: 926-930.

Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C, Saravia N. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1991; 44: 260–271.

Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. **Epidemiology.** 2002; 13: 1399-1402.

White AC Jr, McMahon-Pratt D. Prophylactic immunization against experimental *Leishmania donovani* infection by use of a purified protein vaccine. **J Infect Dis.** 1990; 161: 1313-1314.

Wolfram M, Ilg T, Mottram JC, Overath P. Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells specific for amastigote cysteine proteinases requires intracellular killing of the parasites. **Eur J Immunol.** 1995; 25: 1094-1100.

World Health Organization, 2007. Control of leishmaniasis. Sixteenth World Health Assembly, Geneva, pp. 1–5.

PUBLICAÇÃO



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* as an antigen for delayed-type hypersensitivity assays and serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis

Paulo Henrique da Costa Pinheiro ^{a,b}, Adriana Nunes Pinheiro ^c, Josie Haydée Lima Ferreira ^{a,d}, Francisco Assis Lima Costa ^e, Simone Katz ^a, Clara Lúcia Barbiéri ^{a,*}

^a Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Division of Parasitology, Faculdade NOVAFAPI, Teresina, Piauí, Brazil

^c Division of Histology, Faculdade NOVAFAPI, Teresina, Piauí, Brazil

^d Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí, Picos, Piauí, Brazil

^e Department of Veterinary Clinic and Surgery, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2008

Received in revised form 6 January 2009

Accepted 6 February 2009

Keywords:

Leishmania (Leishmania) chagasi

Canine visceral leishmaniasis

Serodiagnosis

Delayed-type hypersensitivity

Cysteine proteinase

ABSTRACT

A recombinant protein, rLdcccys1, produced by expression of the gene encoding a 30 kDa cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi*, was used to detect specific antibodies in serum by enzyme-linked immunosorbent assays and to test for reactivity in delayed-type hypersensitivity (DTH) responses of dogs from an endemic region of visceral leishmaniasis (VL), Teresina, Piauí State, Brazil. Amastigote or promastigote extracts were also assayed for comparison. The sensitivity for detection of specific antibodies to *L. (L.) chagasi* using rLdcccys1, lysates from *L. (L.) chagasi* promastigotes and amastigotes was 96%, 68%, and 69%, respectively. No cross-reactivity between rLdcccys1 and Chagas disease was observed, and little reactivity was found with sera from dogs with babesiosis and ehrlichiosis. Among 106 sera from symptomatic dogs and 22 from non-infected controls, no false negatives and only two false positive sera were found for rLdcccys1. In contrast, amastigote lysates yielded 11 false positives and 13 false negatives, whereas the corresponding numbers for promastigote lysates were 17 and 16. DTH responses were determined after intradermal injection of rLdcccys1 or amastigote extract and the induration area was measured at 24, 48 and 72 h after injection. All asymptomatic dogs showed a positive intradermal response to rLdcccys1 (>10 mm) which peaked at 48 h, whereas no significant reactivity to the recombinant antigen was found in the symptomatic group. Histological analysis of the intradermal induration showed a predominance of necrotic and hemorrhagic areas in sections from asymptomatic dogs injected with *L. (L.) chagasi* amastigote extract, whereas a typical granulomatous reaction mediated by mononuclear cells was observed in sections from asymptomatic animals injected with rLdcccys1. Grouping data from ELISA and DTH assays with rLdcccys1 and *L. (L.) chagasi* amastigote extracts showed that humoral and cellular responses were inversely correlated during the development of canine VL. Overall, these findings indicate that *L. (L.) chagasi* recombinant cysteine proteinase is potentially useful for diagnosis of canine VL, as well as for the discrimination of clinical and subclinical forms of the disease.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Division of Parasitology, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu 862, 6th floor, 04023-062 São Paulo, S.P., Brazil. Tel.: +55 11 5576 4532; fax: +55 11 5571 1095.

E-mail address: barbieri.clara@unifesp.br (C.L. Barbiéri).

1. Introduction

Visceral leishmaniasis (VL) affects 500,000 people worldwide. Zoonotic VL is caused by *Leishmania* (*L.*) *infantum* in Mediterranean, Middle-East and Asian countries, and by *L. (L.) chagasi* in Latin America (WHO, 2007). These are now considered to be a single species due to their genotypic relationships within the *L. (L.) donovani* complex (Mauricio et al., 2000). Domestic dogs are the main reservoirs of this zoonosis. There has been a dramatic increase in the number of reported human VL cases in Brazil, where both migration from rural areas and ineffective vector and reservoir control contribute to disease urbanization (Arias et al., 1996). Control of canine visceral leishmaniasis (CVL) has been based on the sacrifice of infected animals, which do not respond well to drugs successfully used for human VL chemotherapy. However, the low efficacy of assays for the diagnosis of CVL led to the indiscriminate elimination of dogs in some endemic regions of VL that constitutes a serious problem for public health agents. Diagnostic techniques for canine VL based on the detection of parasites in bone marrow or spleen aspirates are invasive and of relatively low sensitivity (Schallig et al., 2002). Available serological assays include direct agglutination tests (DATs), indirect fluorescent immunoassays and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (Gomes et al., 2008). However, because whole parasite extracts are generally used as antigens, the specificity of these tests for VL is limited by cross-reactivity with the agents of Chagas' disease, ehrlichiosis, rickettsiosis, toxoplasmosis and babesiosis (Barbosa de Deus et al., 2002; El Amin et al., 1986; Harith et al., 1987). Specificity of the tests has improved by the use of purified or recombinant *Leishmania* antigens and comparative evaluation has shown that several of these antigens are suitable for the diagnosis of CVL (Gomes et al., 2008). Anti-A2 antibodies were detected by ELISA in 87% of sera from dogs with symptomatic VL in endemic areas in Brazil, and no significant cross-reaction observed with sera from animals with other common diseases (Carvalho et al., 2002). A sensitivity of 97.1% and a specificity of 98.8% were obtained with the recombinant K39 in ELISA tests in dogs with parasitological evidence of visceral leishmaniasis in Italy and United States (Scalone et al., 2002). Use of the chimeric protein PQ in ELISA tests with canine VL sera isolated from two different regions of Spain showed a sensitivity of 79–93% and a specificity of 96–100% (Soto et al., 1998). Other recombinant antigens were described such as the Hsp70, a diagnostic marker of early steps of CVL, and the histone H3 associated with disease progression (Nieto et al., 1999; Soto et al., 1996, 1998). On the other hand, delayed-type hypersensitivity (DTH) provides a useful tool for diagnosis of clinical CVL, since the test is negative in the symptomatic stage but becomes positive following resolution of VL symptoms (Pinelli et al., 1994). DTH assays are important for disease control, since around 50% of dogs infected with *Leishmania* may not show clinical signs of the disease (Abranches et al., 1991) but are able to infect insect vectors (Alvar et al., 1994; Molina et al., 1994). For this reason the leishmanin skin test (LST) is still the method of choice to evaluate anti-*Leishmania* specific DTH

responses in dogs under field conditions (Baleeiro et al., 2006; Cardoso et al., 1998; Fernández-Bellón et al., 2005).

Leishmania cysteine proteinases have been used as targets for vaccines (Beyrodt et al., 1997; Pinto et al., 2000; Rafati et al., 2001, 2005; Ferreira et al., 2008), chemotherapy (Das et al., 2001; Selzer et al., 1999) and serodiagnosis of VL (Rafati et al., 2003). Previous studies from our laboratory demonstrated that a recombinant cysteine proteinase from *L. (L.) chagasi*, rLdcccys1, is a suitable immunological marker for different stages of VL in humans and dogs and provides high sensitivity and specificity for serodiagnosis of human VL by ELISA assay (Dias et al., 2005; Pinheiro et al., 2005). In the present study the rLdcccys1 antigen was used in DTH and ELISA assays to evaluate its ability in the discrimination of the clinical forms of VL and serodiagnosis in naturally infected dogs living in an endemic region, Teresina, Piauí State, Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Animals

A total of 277 male and female domestic dogs (*Canis familiaris*) of different breeds and ages were screened in the present study. For standardization of the ELISA assays, sera from dogs with visceral leishmaniasis ($n = 209$, of which 103 asymptomatic and 106 symptomatic animals), ehrlichiosis ($n = 16$), and babesiosis ($n = 20$) were obtained from Zoonosis Control Center, Teresina, Piauí, Brazil, an endemic area for visceral leishmaniasis. Sera from dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* ($n = 10$) were used for cross-reaction tests. Samples from healthy dogs from São Paulo ($n = 22$) were also included in the study. Serum from blood samples taken from the cephalic vein were first screened by ELISA. The criterion to screen the 209 dogs with visceral leishmaniasis was the identification of *L. (L.) chagasi* amastigotes in bone marrow smears. Symptomatic dogs were classified according to clinical symptoms: fever, splenomegaly, hepatomegaly, pancytopenia and alopecia, while these symptoms were absent in asymptomatic dogs. Animal procedures were approved by the Ethical Committee for Animal Care from Universidade Federal de São Paulo.

2.2. Parasites

Eight-week-old female golden hamsters were obtained from breeding stocks at the Universidade of Campinas (São Paulo, Brazil). The *L. (L.) chagasi* strain used (MHOM/BR/1972/LD) was characterized and kindly provided by Dr. J.J. Shaw (Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brazil). Parasites were maintained as amastigotes by intraperitoneal inoculation of hamsters. Two months after infection, the hamsters were killed and the spleens were homogenized, treated with 0.2% saponin for 10 min, and centrifuged at $1400 \times g$ for 5 min for isolation of amastigotes. The resulting pellet was resuspended in phosphate buffered saline (PBS), centrifuged at $250 \times g$ for 5 min, the supernatant was centrifuged at $1400 \times g$ for 5 min, and the pellet was resuspended in PBS. The suspension was agitated for 3 h at room temperature and centrifuged at

1400 × g for 5 min. The final pellet containing purified amastigotes was frozen at −20 °C until use (Barbiéri et al., 1990). *L. (L.) chagasi* promastigotes were used in exponential phase of growth. Promastigotes were grown for 2 days at 26 °C in 199 medium (Gibco-BRL) supplemented with 40 mM HEPES, 0.1 mM adenine, 2 mM L-glutamine, 5 µg/ml hemin (in 50% triethanolamine), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10% heat inactivated fetal bovine serum (Gibco-BRL). After growth the promastigotes were centrifuged at 1400 × g for 5 min, the resulting pellet was resuspended in PBS, centrifuged at 1400 × g for 5 min and the pellet was frozen at −20 °C until use.

2.3. Expression and purification of the recombinant cysteine proteinase (rLdcccys1)

The PCR product corresponding to the ORF of the *Ldcccys1* gene was subcloned into the Bam HI and Eco RI restriction sites of the pHis-parallel three expression vector in frame with an amino-terminal six histidine tag (Sheffield et al., 1999). The recombinant plasmids were used to transform *Escherichia coli* BL21(DE3) and protein expression was carried out by inoculating 500 ml of Luria Bertani medium containing 100 µg/ml of ampicillin with a 25 ml overnight bacterial culture. The suspension was incubated on a rotatory shaker at 37 °C until log phase (absorbance at 600 nm = 0.6) was reached. Protein expression was then induced with 0.2 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside for an additional 3 h at 37 °C. After growth, the recombinant bacteria were centrifuged at 4000 × g for 10 min and the recombinant antigen was purified from the insoluble inclusion bodies by affinity chromatograph using a Ni-NTA Superflow agarose matrix (Qiagen, Valencia, CA) (Skeiky et al., 2002). Purified protein was analysed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting using a previously described monoclonal antibody (2E5D3) directed against a 30 kDa cysteine proteinase of *L. (L.) amazonensis* that cross-reacts with a 30 kDa antigen of *L. (L.) chagasi* amastigotes. Lipopolysaccharide (LPS) contamination in batches of the recombinant protein was excluded by *Limulus* assay.

2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay

Microtiter plates (high-binding Costar plates; Corning, Inc., Corning, NY) were coated with the recombinant protein (200 ng/well) or *L. (L.) chagasi* lysates from amastigotes and promastigotes (100 ng/well) in coating buffer (0.05 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.6). The plates were incubated overnight at 4 °C and then blocked with 5% powdered skim milk in PBS for 1 h. Dog sera diluted 1:500 were added and incubated for 1 h at room temperature. After three washes with 0.05% Tween 20 in PBS, anti-dog IgG horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad Laboratories) (diluted 1:500) was added and incubated for 1 h at 37 °C. The plates were washed three times in 0.05% Tween 20 in PBS and the reaction was developed with 0.5 mg/ml of o-phenylenediamine in 0.05 M sodium citrate, pH 4.5, containing 0.03% H₂O₂. The reaction was stopped by

adding 4N H₂SO₄, and the absorbance was measured at 492 nm in a Multiskan Plate Reader (Labsystems Oy, Helsinki, Finland). The cut-off values for each antigen were calculated by adding two S.D. values to the mean absorbance of 22 dog normal sera.

2.5. DTH skin test

For DTH assays lysates of *L. (L.) chagasi* amastigotes were prepared by suspension of 1 × 10⁹ parasites in 1 ml of acetone 100%, centrifugation at 11,000 × g for 2 min. The pellet was washed two times with 1 ml of 100% ethanol, drawn at room temperature, resuspended in 100 µl of PBS, disrupted in an Ultrasonic Processor (XL 2020 - Heat System) and volume was adjusted to 1 ml with PBS.

After establishment of the best concentration of rLdcccys1 and *L. (L.) chagasi* amastigote (AM) lysates to be used in DTH reactions, the skin tests were performed by intradermal injection of either a *L. (L.) chagasi* amastigote extract (20 µg) or rLdcccys1 (8 µg) in the inner surface of the right thigh. Controls received phosphate buffered saline. The induration diameter was measured by use of a caliper after 24, 48 and 72 h. Skin reactions with diameter equal or larger than 5 mm were considered positive. The number of dogs tested was: non-infected dogs (AM: n = 38; rLdcccys1: n = 41); asymptomatic visceral leishmaniasis (AVL) (AM: n = 37; rLdcccys1: n = 56); symptomatic visceral leishmaniasis (SVL) (AM: n = 42; rLdcccys1: n = 47).

2.6. Histological analysis

Forty-eight hours after the intradermal injection of antigens induration biopsies were fixed for 24 h in 10% formaldehyde. The material was dehydrated through graded alcohols, embedded in paraffin and processed according to routine histological techniques. Five micrometers sections were obtained and stained with haematoxylin-eosin. Skin sections were analysed under light microscopy.

2.7. Statistical analysis

One-way ANOVA and Student's *t*-test were used to determine the statistical differences between groups by use of GraphPad Prisma (version 5.0) and *P*-values smaller than 0.05 (*P* < 0.05) were considered significant. The Pearson correlation coefficient was also calculated by use of GraphPad Prisma (version 5.0).

3. Results

3.1. Reactivity of sera from dogs with VL with recombinant cysteine proteinase

To evaluate the antigenicity of *L. (L.) chagasi* rLdcccys1, 10 individual sera from dogs with VL were analysed by ELISA using as antigens purified rLdcccys1 and lysates from *L. (L.) chagasi* amastigotes and promastigotes. The optimal concentration, obtained from a titration curve, was 200 ng/well for rLdcccys1 and 100 ng/well for *L. (L.) chagasi* amastigote and promastigote (PRO) lysates. Fig. 1 shows

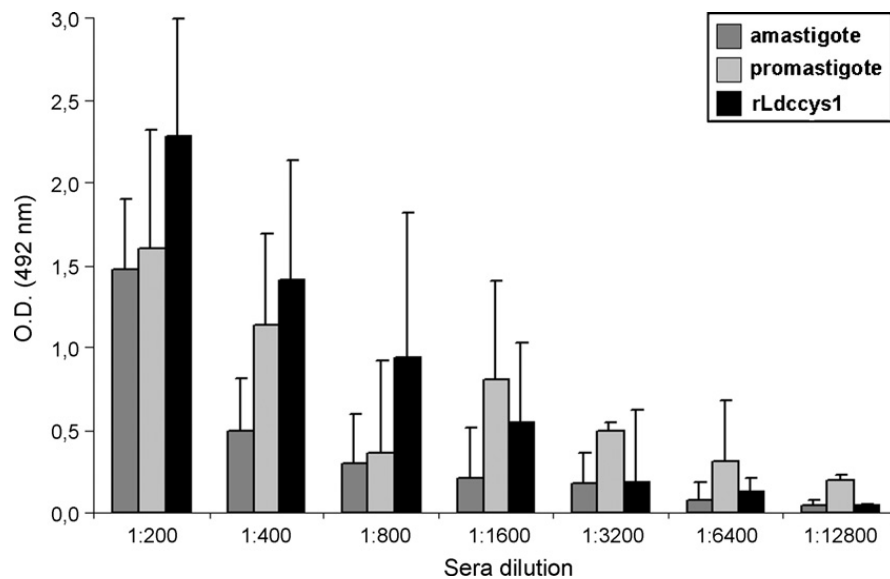


Fig. 1. Enzyme-linked immunosorbent assay of sera from dogs with visceral leishmaniasis (VL) against recombinant cysteine proteinase (rLdcccys1) and *L. (L.) chagasi* amastigote (AM) and promastigote (PRO) extracts. Results are expressed as the mean $\pm$ S.D. optical density (O.D.) of 10 dogs VL serum assayed individually at the indicated dilutions.

that sera from dogs with active VL reacted strongly with rLdcccys1, showing titers comparable to those obtained with promastigote lysates up to a dilution of 1:1600, indicating that dogs with active VL show a strong antibody response against *L. (L.) chagasi* cysteine proteinase.

3.2. Determination of sensitivity and specificity of *L. (L.) chagasi* cysteine proteinase by ELISA

The sensitivity of *L. (L.) chagasi* rLdcccys1 in ELISAs for sera from dogs with VL was determined and compared to that exhibited by *L. (L.) chagasi* amastigote and promastigote lysates. Of 209 sera from dogs with VL, 98% reacted with rLdcccys1, while 86% and 89% were reactive with promastigote and amastigote lysates, respectively (Fig. 2). Among 209 sera, 103 were isolated from asymptomatic, and 106 from symptomatic dogs. The average absorbance values for asymptomatic dogs were 0.45, 0.58, and 0.36 for amastigotes, promastigotes, and rLdcccys1, respectively, whereas averages for symptomatic animals were 1.23, 1.05, and 1.55. These results show that antibody titers of symptomatic dogs were significantly higher than those of asymptomatic animals and the differences in humoral responses between the two groups were more obvious when the rLdcccys1 was used in the assays (Fig. 2).

The specificity of rLdcccys1 was evaluated in assays of sera from healthy controls and from dogs with other diseases including ehrlichiosis, babesiosis and Chagas' disease (Fig. 2). The rLdcccys1 antigen was very specific (96%) when compared to promastigote and amastigote extracts (68% and 69%, respectively), showing no cross-reactivity with sera from dogs with Chagas' disease. Positive reactions with sera from dogs with babesiosis (5%, $n = 20$) and ehrlichiosis (6%, $n = 16$) were relatively low and only two false positive results were found in sera from 22 healthy controls. In contrast, amastigote and promastigote lysates showed high rates of cross-reactivity

with sera from dogs with babesiosis (60% and 55%, respectively, $n = 20$) and ehrlichiosis (40% and 69%, respectively, $n = 16$), although both did not cross-react with sera from dogs with Chagas' disease. Table 1 shows the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the three antigens used in the ELISAs. The data demonstrate that the rLdcccys1 antigen was significantly more specific than *L. (L.) chagasi* extracts for diagnosis of CVL by ELISA.

3.3. DTH skin reactions

DTH responses were evaluated after intradermal injection of either 8 μ g of rLdcccys1 or 20 μ g of *L. (L.) chagasi* amastigote lysate in the inner surface of the right thigh of asymptomatic and symptomatic dogs. Induration areas were measured at 0, 24, 48 and 72 h after injection. No intradermal responses to either rLdcccys1 or *L. (L.) chagasi* amastigote lysates were observed at time zero. At 24, 48 and 72 h after injection all dogs with subclinical form of VL ($n = 41$) showed intradermal response to rLdcccys1 manifested by induration with redness and swelling at the site of the antigen injection. In asymptomatic animals the diameter of induration area was equal or below than 10 mm and peaked at 48 h, whereas symptomatic dogs ($n = 56$) displayed no significant reactivity to the recombinant antigen (Fig. 3). Similar results were observed in dogs injected with *L. (L.) chagasi* amastigote lysate, although the diameter of induration was significantly smaller when compared to animals injected with rLdcccys1 (Fig. 3). In addition, sections of intradermal indurations from asymptomatic dogs injected with *L. (L.) chagasi* amastigote lysate showed a predominance of necrotic and hemorrhagic areas (Fig. 4, B-2), whereas in asymptomatic animals injected with rLdcccys1 (Fig. 4, C-2) typical granulomatous reactions enriched of mononuclear cells were consistently found.

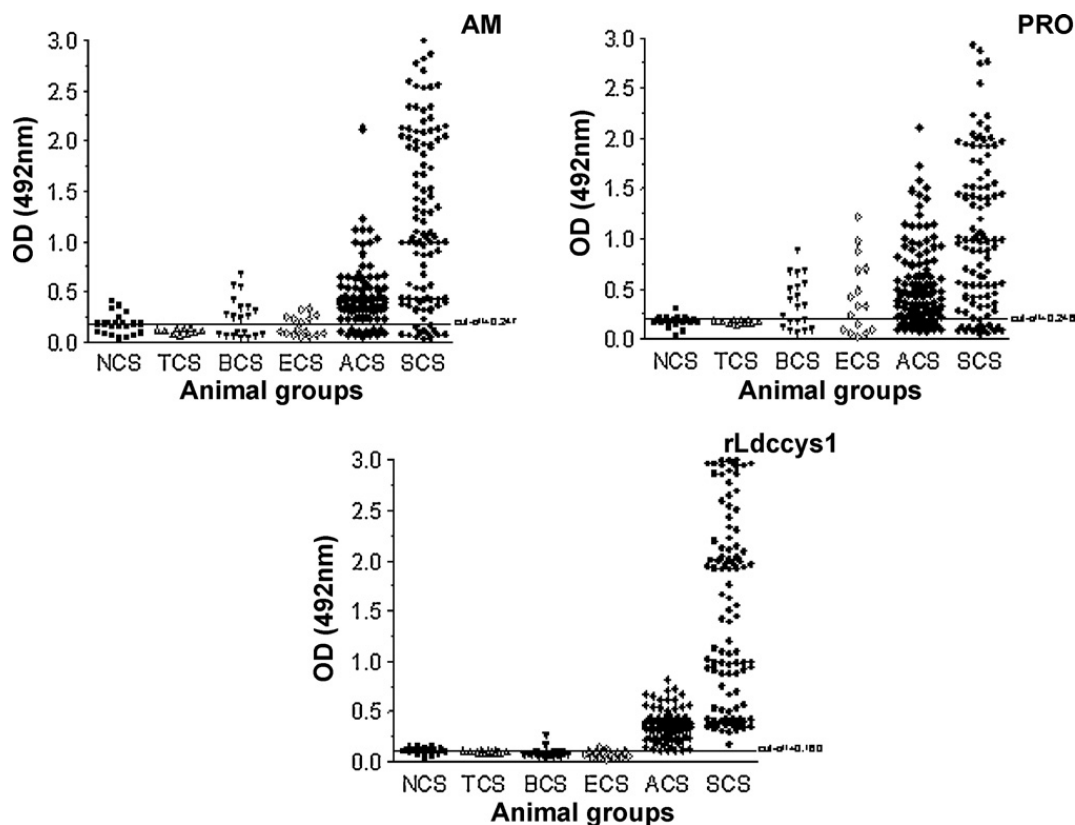


Fig. 2. Reactivity of sera from dogs with visceral leishmaniasis, other infectious diseases, and healthy controls with rLdcccys1 (200 ng/well) and *L. (L.) chagasi* amastigote (AM) and promastigote (PRO) extracts (100 ng/well). NCS, normal canine sera; CCS, Chagas' disease canine sera; BCS, babesiosis canine sera; ECS, ehrlichiosis canine sera; ACS, asymptomatic canine sera; SCS, symptomatic canine sera.

3.4. Inverse correlation between ELISA and DTH in CVL

When data from ELISA assays and DTH reactions performed with rLdcccys1 and *L. (L.) chagasi* amastigote lysates as antigens were grouped, an inverse correlation between humoral and cellular responses during the development of CVL was observed (Fig. 5). Whereas asymptomatic dogs exhibited strong DTH responses and low serum levels of anti-rLdcccys1 immunoglobulin, symptomatic dogs showed diminished or absent DTH reactivity and high antibody titers. This inverse correlation was more evident with rLdcccys1 used as antigen (Fig. 5B) than with *L. (L.) chagasi* amastigote extract (Fig. 5A).

4. Discussion

The 30 kDa cysteine proteinase from *L. (L.) chagasi* amastigotes was first shown to trigger Th1 responses and to partially protect BALB/c mice from the homologous infection (Pinto et al., 2000). We have previously cloned the gene *Ldcccys1* which encodes this cysteine proteinase.

Expression of this gene in bacteria led to the production of a recombinant protein of 47 kDa, rLdcccys1, that corresponds to the 30 kDa cysteine proteinase from *L. (L.) chagasi* (Dias et al., 2005). The present study examines the humoral and DTH responses to rLdcccys1 of dogs infected with *L. (L.) chagasi*. An initial screening in which ELISA assays using the recombinant protein were performed on 10 individual sera from dogs with VL demonstrated that the reactivity of rLdcccys1 was comparable to that exhibited by promastigote extract to a dilution of 1:1600 (Fig. 1). This demonstrates the feasibility of using rLdcccys1 for antibody detection in sera from dogs with VL, as previously showed by use of this antigen in serodiagnosis of human VL (Dias et al., 2005). A cysteine proteinase from *L. (L.) infantum*, CPB, has been used as target for serodiagnosis of CVL in Iran (Rafati et al., 2003). Comparison of our results with those obtained with *L. (L.) infantum* CPB shows that the level of sensitivity with rLdcccys1 (98%) was higher than that reported with the recombinant CPB (76%). In addition, the average of optical densities for rLdcccys1 was 1.55, while this value was of 0.29 for *L. (L.) infantum* CPB (Rafati et al., 2003). Because CPB shares

Table 1

Diagnostic performance of rLdcccys1 and crude antigens of *L. (L.) chagasi* in enzyme-linked immunosorbent assays.

Antigen	Percentage (no. of positive sera/total no. of sera)			
	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
Amastigote	89.69	69.04	88.93	70.73
Promastigote	86.36	68.23	88.55	63.73
rLdcccys1	98.58	96.65	99.05	95.08

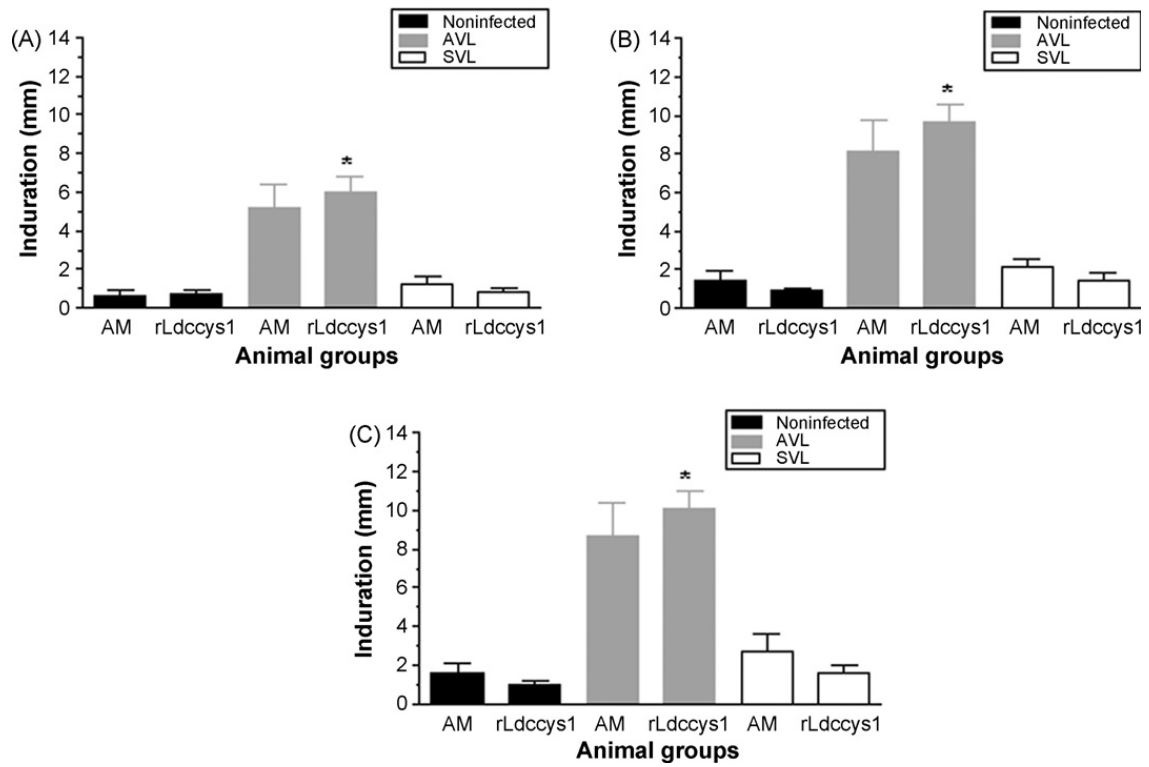


Fig. 3. Delayed-type hypersensitivity elicited by *L. (L.) chagasi* antigens in dogs after 24 h (A), 48 h (B) and 72 h (C). The asterisk represents the significant difference between DTH response elicited by rLdccys1 and *L. (L.) chagasi* amastigote extract (AM) ($P < 0.05$).

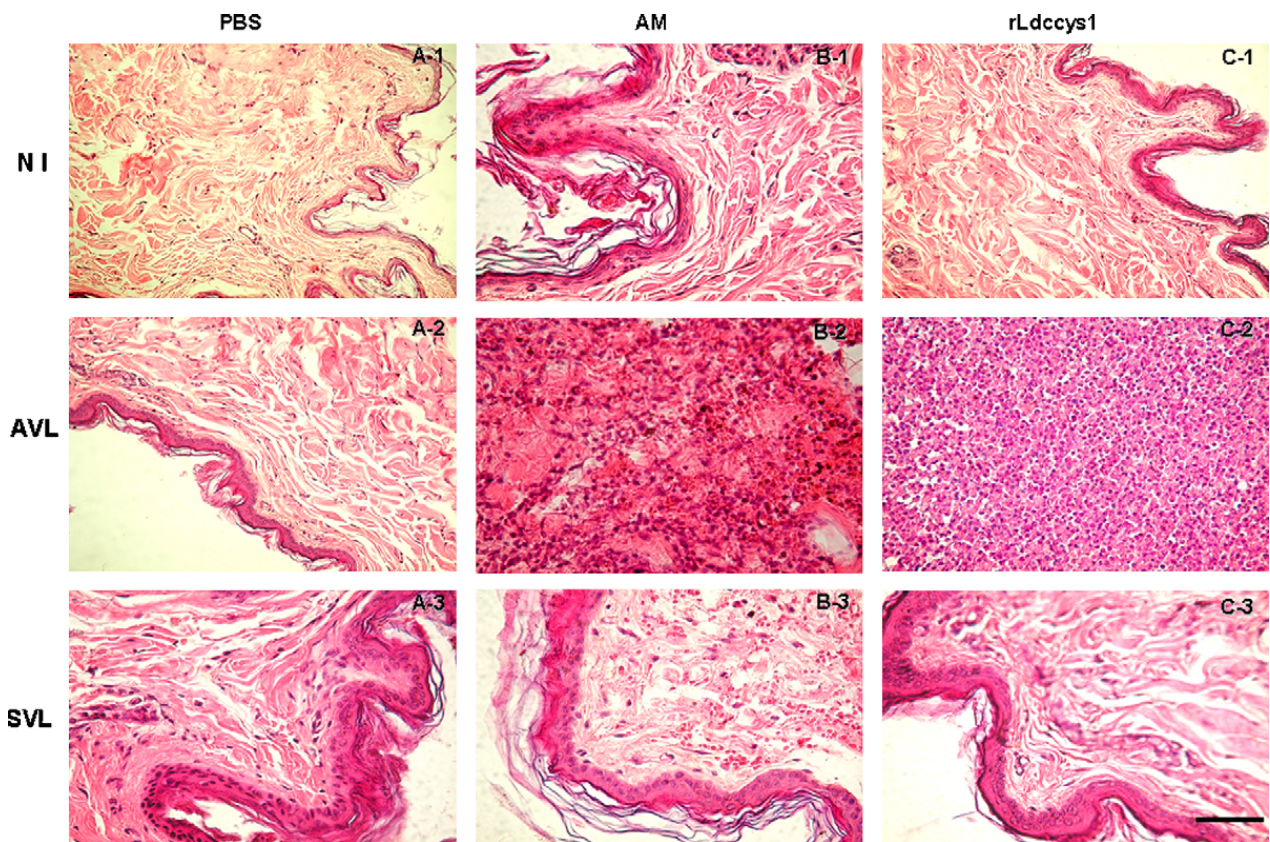


Fig. 4. Histological analysis of subcutaneous induration in *L. (L.) chagasi*-infected dogs following intradermal injection of *L. (L.) chagasi* amastigote extract (AM) and recombinant cysteine proteinase (rLdccys1). Shown are pictures of subcutaneous lesions development 48 h after antigen injection among controls (non-infected dogs), asymptomatic and symptomatic dogs. Hematoxylin–eosin stain. NI, non-infected dogs; AVL, asymptomatic VL dogs; SVL, symptomatic VL dogs. Bar, 150 μ m.

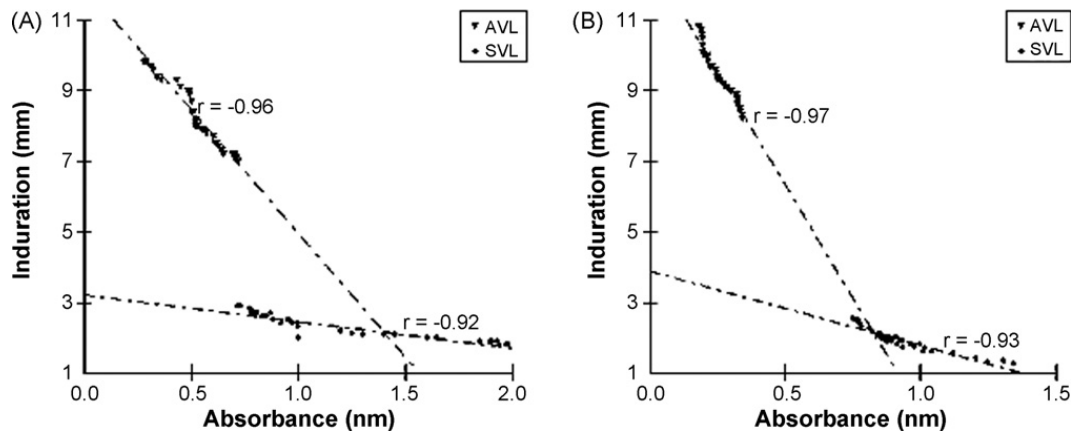


Fig. 5. Inverse correlation between DTH and ELISA data in asymptomatic VL dogs (AVL) and in symptomatic animals (SVL) with *L. (L.) chagasi* amastigote extract (A) or rLdcccys1 (B).

99% identity with Ldcccys1 (Dias et al., 2005), these differences may be associated to the disease stage considered in both studies. Rafati and co-workers did not discriminate asymptomatic from symptomatic dogs. Thus, the lower average absorbances reported with CPB may be due to the antibody evaluation in asymptomatic animals. This conclusion is supported by the significantly lower average of absorbances showed with rLdcccys1 in sera from asymptomatic dogs (0.36) (Fig. 2). However, it may be difficult to compare results obtained in different laboratories.

Antibodies to rLdcccys1 were detected in 98% of the samples from dogs with VL (Table 1). This value is comparable to those reported with recombinant K39 (97%) in canine sera from southern Italy (Scalone et al., 2002) and with *L. (L.) infantum* multicomponent chimeric protein PQ (93%) in dog sera from Spain (Soto et al., 1998). Furthermore, the level of sensitivity with rLdcccys1 was higher than that reported with the *L. (L.) donovani* A2 antigen (87%) (Carvalho et al., 2002). The specificity of rLdcccys1 is high when one considers other infections found in CVL endemic areas (Table 1) and comparable to that observed with recombinant proteins that have been earlier analysed (Carvalho et al., 2002; Rosati et al., 2003; Scalone et al., 2002; Soto et al., 1998). It is also important to observe that the spectrum of absorbance values obtained with rLdcccys1 is higher than that obtained with promastigote and amastigote extracts (71%, 57.5%, and 60% of CVL sera showed an optical density higher than 1 with rLdcccys1, promastigote and amastigote lysates, respectively), favouring easy interpretation of ELISA results.

DTH responses to rLdcccys1 in CVL agree with our previous findings of a Th1 profile in the cellular responses elicited by the recombinant antigen in asymptomatic VL infected humans and dogs and a predominance of Th2 responses in the symptomatic subjects (Pinheiro et al., 2005). The sensitivity of the DTH tests was 100% with both, rLdcccys1 and *L. (L.) chagasi* amastigote extracts. However, cellular responses to rLdcccys1 were stronger than those induced by amastigote lysates (Fig. 3). In addition, rLdcccys1 seems to be safer for use in DTH reaction, since a histological analysis showed a predominance of necrotic and hemorrhagic areas at the site of amastigote lysate injection. These secondary reactions could be followed by

vesiculation and ulceration, as previously observed when increasing concentrations of *Leishmania* antigen were used in skin tests (Weigle et al., 1991).

The different responses of asymptomatic and symptomatic CVL are highlighted by the inverse correlation found between humoral and cellular immunity in the course of CVL (Fig. 5). These findings corroborate earlier reports of specific cellular immunity in asymptomatic dogs naturally infected with *L. (L.) infantum* (Cabral et al., 1992; Pinelli et al., 1994). Our results are also in accordance to those performed by Cardoso and co-workers in the most important CVL region of Portugal. These authors reported that the estimated CVL prevalence increased in asymptomatic dogs evaluated by DTH tests, contrasting with the low prevalence observed in studies performed by parasite culture and serology (Cardoso et al., 1998). Our findings differ from those that found no correlations between DTH and humoral responses when total IgG was quantified in symptomatic and asymptomatic dogs (Cardoso et al., 2007). One possible explanation for such difference from our results may be that these authors analysed total IgG by DAT, whereas we used ELISA assays.

Our findings indicate that recombinant Ldcccys1 from *L. (L.) chagasi* should be useful for both serodiagnosis and DTH tests of CVL, thus allowing the discrimination of clinical and subclinical forms of the disease, an important issue in the control of CVL in endemic areas.

Acknowledgements

We are grateful to Cleiton Catarino for technical support and Solange da Silva Hernandez for providing the sera from dogs infected with *Trypanosoma cruzi*. We also thank Michel Rabinovitch for critically reading the manuscript. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Faculdade NOVAFAPI of Brazil.

References

- Abbranches, P., Silva-Pereira, M.C., Conceição-Silva, F.M., Santos-Gomes, G.M., Janz, J.G., 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.* 77, 557–561.

- Alvar, J., Molina, R., San Andrés, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., González, F., San Andrés, M.D., Boggio, J., Rodríguez, F., 1994. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 88, 371–378.
- Arias, J.R., Monteiro, P.S., Zicker, F., 1996. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2, 145–146.
- Baleeiro, C.O., Paranhos-Silva, M., Santos, J.C., Oliveira, G.G.S., Nascimento, E.G., Carvalho, L.P., Dos-Santos, W.L.C., 2006. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. *Vet. Parasitol.* 139, 21–28.
- Barbiéri, C.L., Doine, A.I., Freymüller, E., 1990. Lysosomal depletion in macrophages from spleen and foot lesions of *Leishmania*-infected hamster. *Exp. Parasitol.* 71, 218–228.
- Barbosa de Deus, R., Mares Guia, M.L., Nunes, A.Z., Costa, K.M., Junqueira, R.G., Mayrink, W., Genaro, O., Tavares, C.A.P., 2002. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1356–1361.
- Beyrodt, C.G., Pinto, A.R., Freymüller, E., Barbiéri, C.L., 1997. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. *Infect. Immun.* 65, 2052–2059.
- Cabral, M., O'Grady, J., Alexander, J., 1992. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 14, 531–539.
- Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J.C., Rodrigues, M., Cabral, M., 1998. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet. Parasitol.* 79, 213–220.
- Cardoso, L., Schallig, H.D.F.H., Cordeiro-da-Silva, A., Cabral, M., Alunda, J.M., Rodrigues, M., 2007. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 35–41.
- Carvalho, F.A.A., Charest, H., Tavares, C.A.P., Matlashewski, G., Valente, E.P., Rabello, A., Gazzinelli, R.T., Fernandes, A.P., 2002. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43, 289–295.
- Das, L., Datta, N., Bandyopadhyay, S., Das, P.K., 2001. Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. *J. Immunol.* 166, 4020–4028.
- Dias, S.S., Pinheiro, P.H.C., Katz, S., Dos Santos, M.R.M., Barbiéri, C.L., 2005. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable of serodiagnosis of American Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 126–132.
- El Amin, E.M., Wright, E.P., Vluc, A., 1986. Characterization of the humoral immune response in Sudanese leishmaniasis: specific antibody detected by class- and subclass-specific reagents. *Clin. Exp. Immunol.* 64, 14–19.
- Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Rodríguez, A., Rutten, V.P., Hoek, A., Ramis, A., Alberola, J., Ferrer, L., 2005. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 107, 163–169.
- Ferreira, J.H., Gentil, L.G., Dias, S.S., Fedeli, C.E., Katz, S., Barbiéri, C.L., 2008. Immunization with the cysteine proteinase Ldcys1 gene from *Leishmania (Leishmania) chagasi* and the recombinant Ldcys1 protein elicits protective immune responses in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 26, 677–685.
- Gomes, Y.M., Cavalcanti, M.P., Lira, R.A., Abath, F.G.C., Alves, L.C., 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.* 175, 45–52.
- Harith, A.E., Kolk, A.H.J., Kager, P.A., Leeuwenburg, J., Faber, F.J., Muigai, R., Kiugu, S., Laarman, J.J., 1987. Evaluation of a new developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 603–606.
- Mauricio, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today* 16, 188–189.
- Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J., 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88, 491–493.
- Nieto, C.G., García-Alonso, M., Requena, J.M., Mirón, C., Soto, M., Alonso, C., Navarrete, I., 1999. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 117–130.
- Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Del Real, G., Ruitenberg, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.
- Pinheiro, P.H.C., Dias, S.S., Eulálio, K.D., Mendonça, I.L., Katz, S., Barbiéri, C.L., 2005. Recombinant Cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-Cell responses. *Infect. Immun.* 73, 3787–3789.
- Pinto, A.R., Beyrodt, C.G., Lopes, R.A., Barbiéri, C.L., 2000. Identification of a 30 kDa antigen from *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes implicated in protective cellular responses in a murine model. *Int. J. Parasitol.* 30, 599–607.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Ghashghaii, A., Salmanian, A.H., Jimenez, M., Mohebbi, M., Masina, S., Fasel, N., 2003. Expression of cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* and their recognition by sera during canine and human visceral leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 103, 143–151.
- Rafati, S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H., Eravani, D., Sanos, S., Kaye, P., Taghikhani, M., Jamshidi, S., Rad, M.A., 2005. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23, 3716–3725.
- Rafati, S., Salmanian, A.H., Taheri, T., Vafa, M., Fasel, N., 2001. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine* 19, 3369–3375.
- Rosati, S., Ortoffi, M., Profiti, M., Mannelli, A., Mignone, W., Bollo, E., Gradoni, L., 2003. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 1153–1156.
- Scalone, A., De Luna, R., Oliva, G., Baldi, L., Satta, G., Vesco, G., Mignone, W., Turilli, C., Mondesire, R.R., Simpson, D., Donoghue, A.R., Frank, G.R., Gradoni, L., 2002. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 104, 275–285.
- Schallig, H.D.F.H., Schoone, G.J., Beijer, E.G.M., Kroom, C.C.M., Hommers, M., Özbel, Y., Özensoy, S., Silva, E.S., Cardoso, L.M., Silva, E.D., 2002. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti *Leishmania* antibodies in dogs. *Vet. Parasitol.* 109, 1–8.
- Selzer, P.M., Pingel, S., Hsieh, I., Ugele, B., Chan, V.J., Engel, J.C., Bogoy, M., Russell, D.G., Sakanari, J.A., McKerrow, J.H., 1999. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11015–11022.
- Sheffield, P., Garrard, S., Derewenda, Z., 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. *Protein Expr. Purif.* 15, 34–39.
- Skeiky, Y.A.W., Coler, R.N., Brannon, M., Stromberg, E., Greeson, K., Crane, R.T., Campos-Neto, A., Reed, S.G., 2002. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL[®] adjuvant. *Vaccine* 20, 3292–3303.
- Soto, M., Requena, J.M., Quijada, L., Alonso, C., 1998. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 58–63.
- Soto, M., Requena, J.M., Quijada, L., Gomez, L.C., Guzman, F., Patarroyo, M.E., Alonso, C., 1996. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 106, 454–461.
- Weigle, K.A., Valderrama, L., Arias, A.L., Santrich, C., Saravia, N., 1991. Leishmanin skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 260–271.
- World Health Organization, 2007. Control of leishmaniasis. Sixteenth World Health Assembly, Geneva, pp. 1–5.