

UTILIZAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA COM SORO HIPERIMUNE DE COELHO ANTI-*LEISHMANIA LEISHMANIA CHAGASI* E ANTI-*LEISHMANIA VIANNIA BRAZILIENSIS* NO DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES CANINAS NO RIO DE JANEIRO - BRASIL

SANTOS, IB.¹; QUINTELLA, P.Q.²; MADEIRA, M.F.³; MIRANDA, L.H.M.¹,
SILVA, D.D.^{1*}; SCHUBACH, E.¹; FIGUEIREDO, F.B.¹; SCHUBACH, T.M.P.¹

RESUMO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose que ocorre nas regiões subtropicais e tropicais. A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é uma zoonose amplamente distribuída no território brasileiro. A leishmaniose visceral canina (LVC) se caracteriza por caquexia progressiva, anemia, febre intermitente, linfadenomegalia generalizada e lesões cutâneas (dermatite exfoliativa, úlceras e alopecia). A LTA canina, se caracteriza pela presença de lesão cutânea ulcerada que costuma ser única, localizada nas orelhas, nariz, bolsa escrotal e membros. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de reações cruzadas dos soros hiperimunes de coelho anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* e anti-*Leishmania (Viannia) braziliensis* utilizados como soro primário na reação de imunohistoquímica (IHQ) no diagnóstico das leishmanioses caninas. Foram estudados 10 fragmentos de lesões cutâneas, incluídos em de parafina, de cães com LTA, confirmada pelo isolamento e caracterização de *L. (V.) braziliensis* (Grupo 1); e 10 fragmentos de pele íntegra da orelha, incluídos em de parafina, de cães com LVC, confirmada pelo isolamento e caracterização de *Leishmania (L.) chagasi*. Foram observadas formas amastigotas na IHQ realizada tanto com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania (L.) chagasi* como com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania (V.) braziliensis* no grupo 1 e grupo 2. Em cães, a ocorrência de reação cruzada na IHQ com soro hiperimune de coelho anti-*Leishmania (L.) chagasi* ou anti-*Leishmania (V.) braziliensis* utilizados como anticorpo primário, possibilita o diagnóstico do gênero *Leishmania* sp. em tecidos, não caracterizando as espécies.

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose que ocorre nas regiões subtropicais e tropicais, causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi* e *Leishmania infantum*, no Novo e no Velho Mundo, respectivamente. Classicamente a leishmaniose visceral canina (LVC) se caracteriza por caquexia progressiva, anemia, febre intermitente, linfadenomegalia generalizada e lesões cutâneas (dermatite exfoliativa, úlceras e alopecia). Outros sinais tais como: colite, ceratoconjuntivite e falência renal podem estar presentes. Formas atípicas têm sido descritas (Lainson, et al., 1987).

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* é uma zoonose amplamente distribuída no território brasileiro. No Estado do Rio de Janeiro, predomina um padrão de transmissão domiciliar e peridomiciliar condicionado à adaptação do vetor, *Lutzomyia intermedia*, ao meio ambiente modificado pelo homem. A LTA pode acometer, isoladamente ou em associação, a pele e as mucosas. Nos cães, se caracteriza pela presença de lesão cutânea ulcerada que costuma ser única, eventualmente múltipla, localizada nas orelhas, nariz, bolsa escrotal e membros (Madeira et al., 2003).

O diagnóstico definitivo das leishmanioses depende da demonstração do agente

1 – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses de Pequenos Animais – IPEC – FIOCRUZ - Rio de Janeiro; 2 – Assistente de Pesquisa – Serviço de Anatomia Patológica – IPEC – FIOCRUZ – Rio de Janeiro; 3 – Pesquisadora – Serviço de Parasitologia – IPEC – FIOCRUZ – Rio de Janeiro.

etiológico em amostras biológicas obtidas das lesões cutâneas ou mucosas, da pele íntegra, dos aspirados do fígado, do baço, da medula óssea, ou de gânglios (Madeira et al 2003). A demonstração do agente etiológico pode ser realizada de forma direta, por meio da citopatologia, da histopatologia, do isolamento em cultura, da inoculação em hamsters e ou do xenodiagnóstico, ou indiretamente, por meio de técnicas imunohistoquímicas, hibridização com sondas de DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR).

A imunohistoquímica (IHQ) vem sendo utilizada para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em amostras de pele íntegra, linfonodo, fígado, baço, rim, glândula adrenal, trato gastrointestinal (estômago, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon), olho, glândula lacrimal, medula óssea, testículo, placenta em cães com LV, com desempenho diagnóstico superior ao exame histopatológico corado pela hematoxilina eosina (HE) e abreviando o tempo do exame dos preparados, pois permite fácil visualização dos parasitos marcados (Tafuri et al., 2004).

Este trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de possíveis reações cruzadas entre os anticorpos de coelho anti-*L. (L.) chagasi* e anti-*L. (V.) braziliensis* utilizados como soro primário na reação de IHQ no diagnóstico das leishmanioses caninas.

METODOLOGIA

1. Amostras biológicas de cães

Foram estudados 10 fragmentos de lesões cutâneas, incluídos em blocos de parafina, de cães com LTA, confirmado pelo isolamento e caracterização de *L. (V.) braziliensis* (Grupo 1); e 10 fragmentos de pele íntegra da orelha, incluídos em blocos de parafina, de cães LV, confirmado pelo isolamento e caracterização de *L. (L.) chagasi* (grupo 2). Os fragmentos de lesões cutâneas e pele íntegra da orelha foram provenientes de cães atendidos no ambulatório do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-ZOONOSE) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) – Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro – RJ - Brasil.

2 Obtenção do soro hiperimune de coelho anti-*Leishmania (L.) chagasi* e anti-*Leishmania (V.) braziliensis*

Para a obtenção do soro hiperimune de coelho anti-*Leishmania* sp. foram realizadas duas etapas: a produção dos antígenos e imunização dos coelhos.

A produção dos antígenos foi realizada no serviço de parasitologia – setor de diagnóstico parasitológico de Trypanosomatídeos do IPEC – Fiocruz. Foram utilizadas amostras das seguintes espécies de *Leishmania*: *L. (L.) chagasi* cepa (MHOM/BR/1974/PP75) e *L. (V.) braziliensis* cepa (MHOM/BR/1975/M2903)

Estas amostras cultivadas em meio bifásico (NNN acrescido de Schneider`s), em fase exponencial, foram transferidas para garrafas de cultivo celular contendo 10 mL de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) com inóculo aproximado de 10% do volume do meio.

Foram submetidos à temperatura de 26 - 28°C em estufa biológica, e no terceiro dia do inóculo, acrescentou-se mais 10 mL de meio Schneider suplementado com 10% de SFB. Após três dias esse volume (20 mL) foi dividido e transferido para outras garrafas contendo 50 mL de meio Schneider cada uma, perfazendo um total de 120 mL de cultura para cada amostra.

Na fase exponencial de crescimento (4^a - 5^a dia), a cultura foi submetida a centrifugação durante 15 minutos a 7000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o

sedimento, re-suspensão em tampão fosfato (pH 7.2). O sedimento foi lavado, re-suspensão em 1,5 mL de tampão de lise contendo inibidores de protease e transferindo para ultra-som para lise dos parasitos. Após a lise total controlada por microscopia óptica, submeteu-se a centrifugação refrigerada a 4°C (10.000 rpm por 5 minutos). O sedimento foi desprezado. O sobrenadante teve seu teor proteico dosado e foi estocado à temperatura de -20°C.

A imunização dos coelhos provenientes do CECAL – Fiocruz para a obtenção do soro, foi realizada no biotério de experimentação do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, da seguinte forma: foram utilizados dois coelhos com peso entre 1800-2000g do sexo masculino para cada antígeno.

Foram inoculados 0,2 mL da solução com 2 mg de proteínas totais emulsificada com adjuvante completo de Freund, com agulha 25 x 8, por via intramuscular no músculo da coxa (1^o dose). Após 14 dias foi realizada a segunda inoculação, injetando 0,1 mL no dorso dos animais por via intradérmica da solução contendo 200 microgramas de proteínas totais emulsificada com adjuvante completo de Freund (2^o dose). Esperaram-se 7 dias até a outra dose. Após 7 dias foi realizada a terceira inoculação (3^o dose), injetando 100 microgramas de proteínas sem adjuvante pela mesma via e no mesmo local da 2^a dose, onde foi observada a reação de Arthus imediata. Após 3 dias foram retirados 2,0 mL de sangue da veia jugular, com agulha 20 x 5,5 para verificação do título de anticorpos pela técnica de imunodifusão. Esperaram-se 7 dias até a outra dose.

Na quarta dose, foram inoculados 100 microgramas de proteínas sem adjuvante pela mesma via e no mesmo local da 2^a e 3^a doses. Após sete dias, como a resposta dos animais foi satisfatória aos antígenos na imunohistoquímica, os coelhos foram anestesiados com 50 mg de quetamina por quilograma de peso, associada a 5 mg de diazepam ou acepromazina por quilograma de peso, por via intramuscular com agulha 25 x 7 e foi realizada a punção cardíaca com agulha 40 x 12 para a retirada total de sangue. O soro foi centrifugado (7000 rpm por 15 minutos a 40°C) dividido em alíquotas de 2 ml, e estocados à 20°C. Alíquotas que apresentavam hemólise foram desprezadas.

3. Imunohistoquímica

Para cada bloco de parafina referente às amostras biológicas dos grupos 1 e 2 foram realizados três cortes, fixados em lâmina silanizada. Os cortes histológicos, foram submetidos a três etapas de incubação em xilol, sendo a primeira de 20 minutos em estufa a 56°C, a segunda e a terceira de 20 e 2 minutos, respectivamente, em temperatura ambiente, para desparafinização. A re-hidratação foi realizada por meio de banhos de álcool em concentrações decrescentes seguido por banhos em água corrente e destilada. A inibição da peroxidase endógena foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 13,5% e metanol, por 40 minutos, seguida por banhos em água corrente e destilada. Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica, em panela de vapor, em tampão citrato pH 6,0: submetiam-se os cortes a 3 minutos de ebulição, que posteriormente resfriavam a temperatura ambiente. Os cortes foram embebidos com soro normal de galinha na diluição de 1:400, por 20 minutos. E em seguida, em solução de albumina sérica bovina (BSA) a 1,5% com leite em pó Molico[®] 10%, por 40 min, a temperatura ambiente, para inibição das ligações inespecíficas. Posteriormente foi realizada a aplicação do anticorpo primário: um corte de cada lâmina dos grupos 1 e 2, foi incubado com soro hiperimune de coelho anti-*L. (L.) chagasi*, e outro corte de cada lâmina dos grupos 1 e 2, com soro hiperimune de coelho anti-*L. (V.) braziliensis*, ambos

na diluição de 1:400 em câmara úmida, *overnight*, a 4°C. O terceiro corte de cada lâmina foi incubado com soro normal de coelho, na mesma diluição, como controle negativo da reação. Após a incubação, os cortes foram lavados com TRIS (Tris-Buffered-Saline) para remoção mecânica do soro anti-*L. (L.) chagasi* e *L. (L.) braziliensis*, esta etapa foi repetida 3 vezes em temperatura ambiente. Foi realizada a aplicação do anticorpo secundário biotinizado universal anti-cabra, anti-coelho e anti-camundongo (DAKO LSAB+ System Kit, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), sobre os cortes, por 25 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram novamente lavados, semelhantemente à etapa anterior. Foi aplicado o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (DAKO LSAB + System kit, DAKO Corporation, CA, EUA) nos cortes, por 25 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram novamente lavados com TRIS, semelhantemente à etapa anterior. A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB TABLETS, DAKO código de catálogo S300, DAKO Corporation, CA, EUA), diluída uma pastilha em 10 mL de água destilada. Utilizados 2 mL desta solução com 15 microlitros de H₂O₂ a 3 %. Esta foi acompanhada ao microscópio óptico, em objetiva de 20x, através do controle positivo previamente selecionado pela riqueza em parasitos, interrompendo-se a reação com água destilada no momento em que as formas amastigotas, acastanhadas, se destacavam no tecido. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados com banhos sequenciais em álcool a concentrações crescentes e xilol, seguido da montagem das lâminas, com lamínula e bálsamo. A positividade foi considerada pela observação de pelo menos uma estrutura marcada em castanho e morfológicamente compatível com uma amastigota.

RESULTADOS

Grupo 1

Foram observadas formas amastigotas em todos os fragmentos de lesões cutâneas na IHQ realizada com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania (L.) chagasi* e com soro policlonal de coelho anti-*L. (V.) braziliensis* (Figuras 1 e 2).

Grupo 2

Foram observadas formas amastigotas em todos os fragmentos de pele íntegra da orelha na IHQ realizada com soro policlonal de coelho anti-*L. (L.) chagasi* e com soro policlonal de coelho anti-*L. (V.) braziliensis* (Figuras 3 e 4).

DISCUSSÃO

A técnica de IHQ, baseia-se na detecção de antígenos “in situ” por meio da utilização de um anticorpo (policlonal ou monoclonal), primário, específico, e de um sistema de enzima e substrato cromógeno que se deposita no local da reação antígeno-anticorpo, possibilitando sua visualização. Nas leishmanioses, diagnóstico depende do achado de estruturas coradas pelo cromógeno, de forma e tamanho compatíveis com amastigotas (Ramos-Vara, 2005).

A produção de anticorpos anti-*Leishmania* sp. é fundamental para a aplicação em técnicas imunológicas de diagnóstico. Neste estudo utilizamos coelhos para a produção de anticorpos específicos anti-*L. (L.) chagasi* e anti-*L. (V.) braziliensis*. De que de acordo com (Froés et al., 2004), estes animais são amplamente utilizados e apresentam bom rendimento na obtenção de anticorpos específicos. Entretanto, alguns autores (Tafari et al., 2004) utilizam soro hiperimune de cão como anticorpo primário anti-*Leishmania* sp..

Neste estudo, observamos a presença de reação cruzada dos soros hiperimunes com as diferentes espécies de leishmania estudadas, fato este não descrito anteriormente na literatura consultada referente às leishmanioses caninas. Entretanto, em espécimes humanos, Livini et al., 1983, descreveram a presença de reação cruzada na reação de

IHQ entre *L. donovani*, *L. tropica* e *L. mexicana*, com soros hiperimunes de coelho anti-*L. donovani*, anti-*L. tropica* e anti-*L. mexicana*.

A IHQ apresenta desempenho diagnóstico superior ao exame histopatológico corado pela hematoxilina eosina (HE) e abrevia o tempo do exame dos preparados, pois permite fácil visualização dos parasitos marcados (Tafari et al., 2004). Entretanto, no presente estudo observamos que, em cães, a IHQ utilizando soros hiperimunes de coelho anti-*L. (L.) chagasi* ou anti-*L. (V.) braziliensis* é capaz de detectar em tecidos formas amastigotas de *Leishmania* sp., não podendo caracterizar a espécie, devido a reação cruzada. Consequentemente, não podemos afirmar pela técnica de IHQ com soro hiperimune de coelho anti-*L. (L.) chagasi* ou anti-*L. (V.) braziliensis*, se o cão apresenta LV ou LTA ou co-infecção de LV com LTA.

Mesmo detectando apenas o gênero *Leishmania* sp., observamos neste estudo que uma grande vantagem da IHQ é a facilidade de manipulação do material a ser submetido ao exame. A amostra de tecido deve ser colocada em material fixador para biópsia, dispensando cuidados especiais como refrigeração (que é necessária para o isolamento em cultura), o que facilita o trabalho de busca ativa de cães, onde o material é coletado e demora 2 a 5 ou mais horas para chegar ao laboratório. Além disto, há também a possibilidade de se realizarem estudos retrospectivos com material incluído em blocos de parafina.

CONCLUSÃO

Em cães, a IHQ com soro hiperimune de coelho anti-*L. (L.) chagasi* ou anti-*L. (V.) braziliensis* utilizados como anticorpo primário, deve ser utilizada para diagnóstico do gênero *Leishmania* sp. em tecidos, não caracterizando as espécies devido a reação cruzada entre as mesmas.

BIBLIOGRAFIA

Froes AM, dos Santos CV, Penha-Filho ML, Teixeira MC, Correa Silva TM, Oliveira GG, et al. Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-*Leishmania chagasi* amastigote antibodies of different animal species. Vet. Immunol. Immunopathol. 2004;99(3-4):135-141.

Lainson R., Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peteres, Killick-Kendrick., editors. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic press; 1987.

Livni N, Abramowitz A, Londner M, Okon E, Morag A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. Virchows. Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 1983;401(2):147-151.

Madeira M.F., Uchôa C.M., Leal C.A., Silva R.M., Duarte R., Magalhães C.M., Barrientos Serra C.M., *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs., Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (2003) 36:551-555.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet. Pathol. 2005; 42:405-426.

Tafari WL, Santos Rde L, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. J. Immunol. Methods. 2004;292(1-2):17-23.